Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof.Dr.W.Staib

ZUR PROBLEMATIK DER ÖSTROGENREZEPTOR-BESTIMMUNG IM MENSCHLICHEN UTERUSGEWEBE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

DOROTHEE BÄRHAUSEN

Düsseldorf 1982

UNIV.
LONDON
LIBR.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0011

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof.Dr.W.Staib

ZUR PROBLEMATIK DER ÖSTROGENREZEPTOR-BESTIMMUNG IM MENSCHLICHEN UTERUSGEWEBE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

DOROTHEE BÄRHAUSEN

Düsseldorf 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.Arnold

Referent
gez.: Prof.Dr.Bojar

Korreferent
gez.: Prof.Dr.Moser

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung 1

B. Material und Methoden 4
I. Material 4
1. Hormone und Verbindungen mit hormoneller Wirkung 4
2. Chemikalien 4
3. Untersuchungsmaterial 6
II. Allgemeine Grundlagen zur Methodik der Steroidhormonrezeptoranalytik 7
1. Begriff der spezifischen Bindung 7
2. Kohleadsorptionstechnik 8
III. Spezielle Methoden 9
1. Zytosolherstellung 9
2. Stabilität des zytosolischen Östrogenrezeptors 9
3. Scatchardanalyse 10
4. Assoziations- und Dissoziationskinetik 12
5. Spezifitätsanalyse 15
6. Untersuchungen zur chemischen Natur der Östrogen-Bindungsstellen 15
7. Isoelektrische Fokussierung 16
8. Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie 18
9. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation 20
10. Agargelelektrophorese 21
11. Proteinbestimmung 22

C. Ergebnisse 24
I. Stabilität des zytosolischen Östrogenrezeptors 24
II. Scatchardanalyse 26
1. Uterus des Menschen 26
2. Uterus der Ratte 29

III. Assoziations- und Dissoziationskinetik 31
1. Assoziation 31
2. Dissoziation 32
3. Ermittlung der scheinbaren Dissoziationskonstanten aus den kinetischen Daten 33
IV. Spezifitätsanalyse 34
V. Untersuchungen zur chemischen Natur der Östrogen-Bindungsstellen 36
VI. Isoelektrische Fokussierung 38
VII. Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie 40
VIII. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation 42
IX. Agargelelektrophorese 44

D. Diskussion 47

E. Literaturverzeichnis 57

A. Einleitung

Die prinzipielle Aufgabe aller Hormone ist die Steuerung bzw. Koordinierung biologischer Vorgänge im Organismus. Diese Funktion können Hormone nur dann erfüllen,wenn sie von den Zellen ihrer Zielorgane erkannt werden.Dieses Erkennen wird durch Hormonrezeptoren vermittelt.Zielorgane sind durch ihren Rezeptorgehalt und damit die spezifische Bindung des betreffenden Hormons definiert. Seit es Jensen und Jacobson 1962 gelungen war,tritiummarkierte Steroidhormone mit hoher spezifischer Aktivität zu synthetisieren,konnten Rezeptorproteine erstmals über die Bindung radioaktiv markierter Steroide nachgewiesen werden (Jensen,1962).Seitdem wurde die Grundlagenforschung stark vorangetrieben.Das Ergebnis der Forschungsarbeit ist das folgende,zur Zeit noch gültige Modell für den Wirkungsmechanismus der Steroidhormone (Jensen,1968,1972;Wittliff,1974):

- Das Steroidhormon dringt,vermutlich durch freie Diffusion,in die Zellen von Erfolgs- und Nichterfolgsorganen ein.
- Nur die Erfolgsorgane enthalten hormonspezifische Rezeptoren.
- In Abwesenheit des Steroids sind die Rezeptoren im Zytoplasma lokalisiert.
- Das Steroid verbindet sich mit dem Rezeptor zum zytoplasmatischen Hormon-Rezeptor-Komplex.
- Der Hormon-Rezeptor-Komplex wird in einer temperaturabhängigen Reaktion transformiert (aktiviert).
- Durch Translokation wird der aktivierte Hormon-Rezeptor-Komplex in den Kern übertragen.
- Im Chromatin des Zellkerns wird der Hormon-Rezeptor-Komplex an einen Akzeptor gebunden.
- Der Hormon-Rezeptor-Komplex destabilisiert die Doppelhelix im Bereich eines Gens und leitet damit die Transkription der genetischen Information auf Boten-RNA ein.

UNIV. LEIDEN

- Das gebildete Transkript wird dann aus dem Kern transportiert.
- Auf der Translationsebene wird die umgeschriebene genetische Information zur Synthese spezifischer Eiweißmoleküle verwendet.
- Über die Regulation der Genaktivität steuern Steroidhormone Wachstum,Differenzierung und metabolische Aktivität ihrer Zielgewebe.

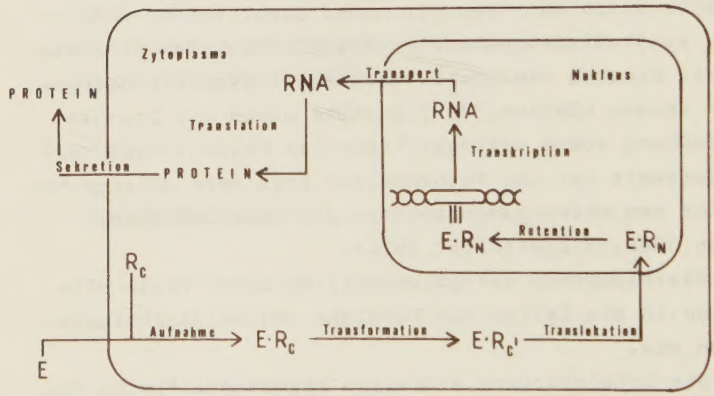

Abbildung 1 : Modell für den Wirkungsmechanismus der Steroidhormone in den Zellen ihrer Erfolgsorgane.

E : Hormon,hier : Östradiol

R_C : zytoplasmatischer Rezeptor

$E \cdot R_C$: Hormon-Rezeptor-Komplex

$E \cdot R_{C'}$: aktivierter Hormon-Rezeptor-Komplex

$E \cdot R_N$: in den Kern translozierter Hormon-Rezeptor-Komplex

Auf Grund dieses Modells ist es verständlich,daß Steroidhormon-Rezeptoren im Zytoplasma und im Kern nachweisbar

sind.Die Bestimmung im Zytoplasma ist allerdings einfacher und wird deshalb häufiger zur Identifizierung von normalen oder pathologischen Zielgeweben verwendet.Eine Fraktion des Zytoplasmas ist das Zytosol,der durch Zentrifugation bei 105000 x g gewonnene Überstand eines Gewebehomogenats (Korenman,1968 b,1969).
Außer in der Grundlagenforschung spielt die Rezeptorenanalyse aber auch in der angewandten Forschung eine wichtige Rolle.Erwähnt seien hier vor allem die Östrogen- und Gestagen-Rezeptor-Bestimmungen für die gezielte endokrine Therapie des Mammakarzinoms (Block,1975;Bojar, 1980 a) und ihre klinischen Korrelationen (Wittliff,1971; McGuire,1977;De Sombre,1979) sowie die Glucocorticoid-Rezeptor-Untersuchungen an Leukämiezellen (Yarbro,1977; Lippmann,1978;Crabtree,1978).
Die zuverlässigsten und reproduzierbarsten Methoden zur Steroidhormon-Rezeptor-Analytik sind der Mehrpunkt-Dextrankohleassay (mit Auswertung der Bindungsdaten nach der Methode von Scatchard,1949) und die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (De Sombre,1979).Daneben gibt es jedoch eine ganze Reihe anderer Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Steroidhormon-Rezeptoren:Assoziations- und Dissoziationskinetik,Spezifitätsanalysen,Untersuchungen zur chemischen Natur der Bindungsstellen,isoelektrische Fokussierung,Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie und Agargelelektrophorese.
Die Anwendung der bewährten Methoden ist jedoch teilweise problematisch.So war es Gegenstand meiner Arbeit,die Besonderheiten des humanen Uterinrezeptors zu untersuchen.Wenn sich ein abweichendes Verhalten der Ergebnisse von anerkannten Vorstellungen zeigte,wurden vergleichende Untersuchungen am Rattenuterus durchgeführt.

B. Material und Methoden

I. Material

1. Hormone und Verbindungen mit hormoneller Wirkung

($6,7-^{3}H$)-Östradiol-17β
=(1,3,5(10)-Östratrien-3,17β-diol)
spezifische Aktivität:41 Ci/mmol
Hersteller:Amersham Buchler
Die Reinheit wurde durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen auf Merck Kieselgel 60 Fertigplatten in Chloroform/Aceton (7:3) und anschließende Auswertung mit einem BF-Scanner,Typ LB 2721,überprüft.

Aldosteron,Dexamethason,Diäthylstilböstrol,Progesteron, Testosteron
Hersteller:Calbiochem,San Diego,USA

2. Chemikalien

Agar purum
Hersteller:Behringwerke,Frankfurt

Ampholine pH 3,5-10
Hersteller:LKB-Instrument,Bromma,Schweden

Biofluor
Hersteller:New England Nuclear

p-Chloromercuriphenylsulfonsäure
Hersteller:Sigma,St.Louis,USA

DE 52 Anionen-Austauscher
Hersteller:Whatman,Maidstone,England

Dextran T 500
Hersteller:Pharmacia,Uppsala,Schweden

Mercaptoäthanol
Hersteller:Merck,Darmstadt

Monothioglycerin
Hersteller:Sigma,St.Louis,USA

Norit A
Hersteller:Serva,Heidelberg

Pronase
Hersteller:Calbiochem,San Diego,USA

neutrale Protease
Hersteller:Boehringer,Mannheim

Quickszint 212
Hersteller:Zinsser,Frankfurt

Rinderserumalbumin
Hersteller:Behringwerke,Frankfurt

Sephadex G 25
Hersteller:Pharmacia,Uppsala,Schweden

Thermolysin
Hersteller:Boehringer,Mannheim

Titriplex III = Äthylendinitrilotetraessigsäure,Dinatriumsalz (Dihydrat), $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2\ H_2O = Na_2EDTA$
Hersteller:Merck,Darmstadt

Tris-HCl = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Hersteller:Serva,Heidelberg

Ultrodex
Hersteller:LKB-Instrument,Bromma,Schweden

Alle übrigen Chemikalien und Reagenzien,die verwendet wurden,entsprachen der Klassifikation p.A. und wurden von Merck,Darmstadt,geliefert.

3. Untersuchungsmaterial

a) Rattenuterus
Das tierische Uterusgewebe stammte von ca. 150-200 g schweren Wistar II-Ratten.

b) Menschlicher Uterus
Durch das Entgegenkommen von Prof.Dr.med.Beck,Frauenklinik der Universität Düsseldorf,und Prof.Dr.med.Bokelmann,Lukas-Krankenhaus Neuss,konnten Untersuchungen am menschlichen Uterus durchgeführt werden.
Die Patientinnen aus Prä- und Postmenopause waren wegen Myomen oder Subtotalprolaps zur operativen Entfernung des Uterus in die Klinik eingewiesen worden.
Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Uteri in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dort bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

II. Allgemeine Grundlagen zur Methodik der Steroidhormonrezeptoranalytik

1. Begriff der spezifischen Bindung

Bei der Bindung eines Hormons im Zytoplasma muß man zwischen spezifischer und nichtspezifischer Bindung unterscheiden.
Die spezifische Bindung des Hormons an den Rezeptor zeichnet sich durch hohe Affinität bei geringer Kapazität aus.
Die nichtspezifische Bindung an andere zytoplasmatische Komponenten ist charakterisiert durch geringe Affinität und hohe Kapazität.
Das radioaktiv markierte Hormon sättigt auch schon in niedrigen Konzentrationen die hochaffinen Bindungsstellen ab, jedoch läßt es sich durch einen Überschuß an nichtmarkiertem Hormon von diesen Bindungsstellen verdrängen.
An den geringaffinen Bindungsstellen hoher Kapazität läßt sich das markierte Hormon auch durch starke Verdünnung mit nichtmarkiertem Hormon nicht verdrängen, da diese nicht abgesättigt werden können und das unmarkierte Hormon nur zusätzlich binden (Cake, 1975).
Bei niedrigen Östrogenkonzentrationen liegen auf Grund der hohen Affinität 90% der Bindung als spezifische Bindung vor. Die Affinität zum Rezeptor ist etwa 5 Zehnerpotenzen höher als die zum Serumalbumin.
Um im Experiment zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung zu unterscheiden, wurde einem Ansatz nur tritiiertes Hormon (=totale Bindung), einem Parallelansatz zusätzlich ein Überschuß an nichtmarkiertem Hormon (=nichtspezifische (NS) Bindung) zugesetzt. Subtrahiert man die Werte dieser beiden Ansätze voneinander, so erhält man die spezifische Bindung (King, 1974).
Die verwendeten Hormonkonzentrationen lagen im Bereich von 1-60 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β und 1 µmol/l unmarkiertem Diäthylstilböstrol (DES).

2. Kohleadsorptionstechnik

Im allgemeinen wurde die Inkubation des Zytosols mit radioaktiven Steroiden durch die Zugabe von Kohleadsorbens gestoppt (Korenman,1968 b;Mester,1970).Dabei erfolgt eine Adsorption des freien,ungebundenen Hormons an die Kohle.Das Dextran soll einerseits eine mögliche Adsorption von Proteinen,und damit auch des Hormonrezeptors,an die Kohle verhindern,andererseits das Kohlesediment nach späterer Zentrifugation stabilisieren.
Das Kohleadsorbens wurde folgendermaßen hergestellt:
1% Norit A, 0,05% Dextran T 500,präpariert in Tris-Puffer A (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l Na_2EDTA, 12 mmol/l Monothioglycerin, pH 7,4).Diese Suspension wurde über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend mehrmals in Tris-Puffer A gewaschen.

III. Spezielle Methoden

1. Zytosolherstellung

Alle im nachfolgenden beschriebenen Untersuchungen des Östrogenrezeptors erfolgten im Zytosol.
Die in flüssigem Stickstoff gelagerten menschlichen Uterusteile wurden gewogen,mit der doppelten Menge (w/v) Tris-Puffer A versetzt und bei 0-2° C aufgetaut.Die frischen Rattenuteri wurden sofort nach der Entnahme mit Tris-Puffer A auf 0-2° C heruntergekühlt,ebenfalls gewogen und mit der doppelten Menge (w/v) Tris-Puffer A versetzt.
Dann wurde das Gewebe mit der Schere zerkleinert und mit einem Ultraturrax homogenisiert (5x15 sek. mit jeweils 30 sek. Pause).Das so gewonnene Homogenat wurde anschließend 45 min. mit 105000 x g bei 0° C in einer Beckman Ultrazentrifuge,Typ L5-75,mit einem Spinco 75 Ti Festwinkelrotor zentrifugiert.
Der Überstand,das Zytosol,wurde mit einer Pasteur-Pipette so abgesaugt,daß der Lipidring auf der Oberfläche des Zytosols nicht aufgewirbelt wurde,und 1:1 (v/v) mit Tris-Puffer A verdünnt.
Das Zytosol wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

2. Stabilität des zytosolischen Östrogenrezeptors

Für einige Experimente,wie z.B. die Scatchard-Analytik, ist es notwendig,das Hormon-Rezeptor-System in seinem dynamischen Bindungsgleichgewicht zu erfassen.Daher wurde zunächst die Bildung der Hormon-Rezeptor-Komplexe und deren Stabilität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht.In diesen Versuchen wurde die Analyse der raschen Initialreaktion zwischen Hormon und Rezeptor ausgeklammert,da diese Gegenstand detaillierter Untersuchungen der Assoziations- und Dissoziationskinetik waren und in späteren Experimenten durchgeführt wurden (s.III.4).

Zu einer größeren Menge Zytosol wurde soviel radioaktives Hormon hinzugegeben,daß die Endkonzentration 10 nmol/l betrug.Parallel dazu wurde ein NS-Ansatz mit zusätzlich unmarkiertem Hormon (Endkonzentration 1 µmol/l) hergestellt. Zu vorgegebenen Zeiten wurden dann jeweils Proben von 200 µl aus den Zytosolen entnommen und mit 500 µl Kohleadsorbens versetzt.Nach einer Inkubationszeit von 10 min. bei 0-2° C wurden die Ansätze 4 min. bei 12000 U/min. (entsprechend 9000 x g) in einer Eppendorf Zentrifuge,Typ 3200,zentrifugiert.
Jeweils 200 µl des klaren Überstandes wurden zusammen entweder mit 10 ml Biofluor oder mit 5 ml Quickszint 212 in Plastikszintillationsgefäße übertragen und die Radioaktivität in einem Packard-Flüssigkeitsszintillationszähler (Modell 2650) gemessen.
Zur Auswertung wurde die Konzentration des spezifisch gebundenen ^{3}H-Östradiol-17ß gegen die Zeit aufgetragen.

3. Scatchard-Analyse

Geht man davon aus,daß jedes Rezeptormolekül zu einem Zeitpunkt nur ein Hormonmolekül binden kann und daß diese Interaktion reversibel ist,so gilt für die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes:

$$\underset{[H]}{[\text{Hormon}]} + \underset{[R]}{[\text{Rezeptor}]} \rightleftharpoons \underset{[H\text{-}R]}{[\text{Hormon-Rezeptor-Komplex}]}$$

Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt für den Gleichgewichtszustand der Reaktion folgender Zusammenhang:

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{[H\text{-}R]}{[H] \times [R]}$$

K_A = Assoziationskonstante
K_D = Dissoziationskonstante
$[H\text{-}R]$ = gebundenes Hormon

$[H]$ = freies Hormon
$[R]$ = freie Hormonrezeptoren

Ersetzt man $[H\text{-}R]$ durch B, $[H]$ durch F und $[R]$ durch R_o-B (wobei R_o der Gesamtrezeptorkonzentration entspricht),so gelangt man zu folgender Formulierung:

$$K_A = \frac{B}{F \times (R_o - B)}$$

$$\frac{B}{F} = K_A (R_o - B)$$

$$\frac{B}{F} = -K_A B + K_A R_o$$

Hierbei handelt es sich um eine Geradengleichung,wobei sich aus der Steigung der Geraden die scheinbare Assoziationskonstante ermitteln läßt.
Für diese Gerade gilt:

$$\text{wenn } \frac{B}{F} \longrightarrow 0$$
$$\text{dann } K_A B \longrightarrow K_A R_o$$
$$B \longrightarrow R_o$$

Daraus folgt,daß der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse der maximalen Hormonbindungskapazität bzw. der molaren Rezeptorkonzentration entspricht.
Für diese Analyse wurde das Zytosol mit steigenden Konzentrationen von ^{3}H-Östradiol-17β titriert.Die Ansätze für die nichtspezifische Bindung enthielten zusätzlich noch unmarkiertes DES.Die Inkubation wurde mit der Dextrankohlemethode beendet.
Die ermittelten Ergebnisse wurden nach der Methode von Scatchard (1949) ausgewertet.Anhand der spezifischen

Bindung wurde das Verhältnis zwischen gebundenem und freiem Hormon gegen die Molarität des gebundenen Hormons aufgetragen.

4. Assoziations- und Dissoziationskinetik

Die aus den Gleichgewichtsanalysen (Scatchard Plot) ermittelte Dissoziationskonstante (K_D) kann auch aus den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion errechnet werden.
Darüber hinaus kann man aus der Dissoziationskinetik die Halbwertszeit für den Zerfall des Hormon-Rezeptor-Komplexes ermitteln und daraus auf dessen Stabilität schließen.
Weiterhin kann man aus kinetischen Studien Informationen über den Reaktionsmechanismus erhalten bzw. überprüfen, ob eine Reaktion nach dem angenommenen Mechanismus abläuft.
Die Assoziationsreaktion wird als Reaktion 2.Ordnung dargestellt, die Dissoziationsreaktion als Reaktion 1.Ordnung (Koblet).

Assoziationsreaktion

Die Assoziation verläuft nach der schematischen Gleichung:

$$[H] + [R] \xrightarrow{K_1} [H\text{-}R]$$

Hormon und Rezeptor reagieren mit der Geschwindigkeitskonstanten K_1 zum Hormon-Rezeptor-Komplex.
Bei der Assoziationsreaktion wird vorausgesetzt, daß es sich um eine Reaktion 2.Ordnung handelt, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional der Konzentration der beiden reagierenden Verbindungen:

$$\frac{d\,[H\text{-}R]}{dt} = K_1 \times [H]\,[R]$$

In den folgenden Gleichungen werden die Ausgangskonzentrationen von Hormon und Rezeptor mit $[H_o]$ und $[R_o]$ bezeichnet.Zum Zeitpunkt t sind sie um die Menge des gebildeten Hormon-Rezeptor-Komplexes $[H\text{-}R]$ verringert.Die Gleichung lautet dann:

$$\frac{d\,[H\text{-}R]}{dt} = K_1\,([H_o]-[H\text{-}R])\,([R_o]-[H\text{-}R])$$

Durch Integration und weitere mathematische Umformung erhält man eine Geradengleichung:

$$\log \frac{[R_o] \times [H_t]}{[H_o] \times [R_t]} = \frac{K_1\,([H_o]-[R_o])}{2{,}3} \times t$$

Trägt man $\log \frac{[R_o] \times [H_t]}{[H_o] \times [R_t]}$ gegen die Zeit t auf (Westphal,1971),so erhält man als Steigung der Geraden $K_1\,([H_o]-[R_o])/2{,}3$.Daraus läßt sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante K_1 ($l \cdot mol^{-1} \cdot sec^{-1}$) berechnen (Sanborn,1971).

Zur Messung der Assoziationskinetik wurde zu einer größeren Menge Zytosol soviel radioaktives Hormon pipettiert, daß die Endkonzentration 10 nmol/l betrug.Parallel dazu wurde ein NS-Ansatz mit zusätzlich unmarkiertem Hormon, Endkonzentration 1 µmol/l,hergestellt.
Dann wurden zu vorgegebenen Zeiten Proben von 200 µl aus den Zytosolen entnommen,mit der Kohlemethode gestoppt und die spezifische Bindung berechnet.
Zur Auswertung braucht man folgende Daten:

$[H\text{-}R]_t$: spezifische Bindung zum Zeitpunkt t
$[H_o]$: freies Hormon zum Zeitpunkt t_o
= Gesamthormonkonzentration,meßbar
$[H_t]$: $[H_o]-[H\text{-}R]_t$,freies Hormon zum Zeitpunkt t
$[R_o]$: freier Rezeptor zum Zeitpunkt t_o
= Gesamtrezeptorkonzentration,kann durch parallele Scatchard-Analyse ermittelt werden

$[R_t]$: $[R_o]-[H-R]_t$, freier Rezeptor zum Zeitpunkt t

Dissoziationsreaktion

Die Dissoziation des Hormon-Rezeptor-Komplexes läßt sich formal als Reaktion 1.Ordnung beschreiben.

$$[H-R] \xrightarrow{K_2} [R] + [H]$$

Der Hormon-Rezeptor-Komplex zerfällt mit der Geschwindigkeitskonstanten K_2 in Hormon und Rezeptor.Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional der Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes:

$$\frac{-d\,[H-R]}{dt} = K_2\,[H-R]$$

Durch Integration und weitere mathematische Umformung erhält man eine Geradengleichung:

$$\log \frac{[H-R]_o}{[H-R]_t} = \frac{K_2}{2,3} \times t$$

Trägt man $\log \frac{[H-R]_o}{[H-R]_t}$ gegen die Zeit t auf,so erhält man als Steigung der Geraden $K_2/2,3$.Daraus läßt sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante K_2 (sec^{-1}) ermitteln. Zur Messung der Dissoziationskinetik wurde eine größere Menge Zytosol mit ^{3}H-Östradiol-17B (Endkonzentration 10 nmol/l) und parallel dazu ein NS-Ansatz mit zusätzlich unmarkiertem DES (Endkonzentration 1 µmol/l) bis zum Reaktionsgleichgewicht vorinkubiert.Danach wurde das unkompetierte Zytosol halbiert.Der eine Teil wurde unbehandelt weiterinkubiert (Kontrollwerte),während dem anderen Teil nun ebenfalls 1 µmol/l unmarkiertes DES zugesetzt wurde, um durch Dilution mit unmarkiertem Hormon eine Rückbindung abdissoziierender markierter Hormonmoleküle zu verhindern (Hauptwerte).Sämtliche Zytosole wurden weiterin-

kubiert.
Zu bestimmten Zeiten wurden jeweils Proben von 200 µl aus den Zytosolen entnommen und nach der Kohlemethode getrennt.
Die spezifische Bindung der Kontrollwerte $[H\text{-}R]_o$ wurde für die jeweilige Entnahmezeit mit 100% angenommen und mit der spezifischen Bindung der Hauptwerte $[H\text{-}R]_t$ verglichen.

5. Spezifitätsanalyse

Um die Hormonselektivität der zytosolischen Östrogenbinder bei niedrigen und hohen Konzentrationen von tritiiertem 17ß-Östradiol zu ermitteln, wurden Verdrängungsanalysen außer mit unmarkiertem DES mit den Sexualhormonen Progesteron und Testosteron, dem Glucocorticoid Dexamethason und dem Mineralocorticoid Aldosteron durchgeführt.
In diesen Versuchen erfolgte eine gleichzeitige Inkubation mit radioaktiv markiertem Hormon und den jeweiligen unmarkierten Kompetitoren.
Jeweils 200 µl Zytosol wurden mit steigenden Konzentrationen ^{3}H-Östradiol-17ß inkubiert, entweder allein oder zusammen mit 1 µmol/l der unmarkierten Kompetitoren. Die Reaktion wurde durch die Dextrankohle-Methode beendet.

6. Untersuchungen zur chemischen Natur der Östrogen-Bindungsstellen

In diesen Versuchen wurde die Empfindlichkeit der zytosolischen Östrogenbinder gegenüber bestimmten Enzymen wie Pronase, neutrale Protease und Thermolysin sowie gegenüber SH-Gruppen blockierenden Substanzen wie p-Chloromercuriphenylsulfonsäure überprüft.
Dabei wurden diese Substanzen nach der üblichen Inkubation zugesetzt, um zu messen, wieweit die spezifische Bin-

dung zerstört wird.
Für die totale Bindung wurden jeweils 200 µl Zytosol mit steigenden Konzentrationen ^{3}H-Östradiol-17β versetzt.Die Ansätze für die nichtspezifische Bindung enthielten neben dem radioaktiven Hormon noch unmarkiertes DES.Nach der Inkubation wurden die Proben 30 min. bei 0-2° C abgekühlt.Anschließend wurden die Enzyme (1,25 mg/ml Zytosol) bzw. der SH-Blocker (10 mmol/l) zugegeben und die Proben für 30 min. bei 0-2° C inkubiert.Mit Kohlebehandlung wurden die Versuche beendet.

7. Isoelektrische Fokussierung

Elektrofokussierung ist die Trennung von Proteinen nach ihren isoelektrischen Punkten in einem pH-Gradienten (Haglund,1971).Wenn eine Probe von Proteinen in den pH-Gradienten gegeben wird,erhalten die Proteinmoleküle verschiedene Ladungen,die vom isoelektrischen Punkt für jedes Protein und vom pH-Wert an der Stelle,wo sich das Protein befindet,bestimmt werden.Ist der pH kleiner als der IP,so ist die Ladung positiv,ist er größer,so ist sie negativ.Danach wandert jedes Proteinmolekül zu dem pH-Wert im System,bei dem es isoelektrisch,d.h. elektrisch neutral,ist.Die Proteine werden also genau an dem Punkt fokussiert,wo der pH-Wert gleich dem IP-Wert ist.
Der pH-Gradient wird im elektrischen Feld mittels Ampholine-Trägerampholyte (LKB-Instrument) aufgebaut,die in verschiedenen pH-Bereichen erhältlich sind.Je enger der pH-Bereich gewählt wird,um so höher ist die Trennschärfe.Die Ampholine-Trägerampholyte sind Mischungen aus einer großen Zahl von verschiedenen aliphatischen Polyamino-Polycarboxylsäuren.Sie haben im Vergleich zueinander kleine Unterschiede im IP,die über den gewählten pH-Bereich verteilt sind.Am Anfang eines Versuches ist der pH-Wert im ganzen System konstant.Erst im elektrischen Feld wandern die Trägerampholyte und erstellen so einen pH-Gradienten.Ebenso beginnen die Probenproteine zu wandern,

wenn die Spannung angelegt wird.
Die isoelektrische Fokussierung wurde in granulierten Gelen durchgeführt.Dazu wurde eine 5%ige Ampholinelösung des gewählten pH-Bereichs (3,5-10) mit folgenden Reagenzien hergestellt: 6 ml Ampholine, 100 µl Monothioglycerin, 114 ml Aqua dest., 4 g Ultrodex (LKB-Instrument). 100 ml dieses Ampholinegemischs wurden in die Trennkammer gegossen.Das Gel wurde solange getrocknet,bis der Wassergehalt um 34% reduziert war.Das Gel wurde auf 2° C gekühlt.Diese Temperatur wurde durch eine Kühlplatte,die an einen Umlaufthermostaten (Colera MC 8 Kühlaggregat) angeschlossen war,auch während des Versuchs eingehalten. Die Trägerampholyte,die sich in der Nähe der Elektroden befinden,müssen gegen anodische Oxidation und kathodische Reduktion an den Elektroden geschützt werden.Dazu wird die Anode mit einer sauren Lösung (H_3PO_4) und die Kathode mit einer alkalischen Lösung (NaOH) umgeben.
1,4 ml Zytosol wurden mit 5 oder 25 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β inkubiert und anschließend einer Kohlepellet-Behandlung unterzogen.Hierbei handelt es sich um eine Modifikation der DCC-Methode,um eine Verdünnung des Zytosols durch das Kohlereagenz zu verhindern.Zunächst wird das Kohleadsorbens allein zentrifugiert,dann der klare Überstand verworfen und das inkubierte Zytosol direkt auf das Kohlepellet pipettiert.Das weitere Vorgehen erfolgt wie unter B.III.2 beschrieben.
Bevor die Probe (1 ml) aufgetragen wurde,hatte sich in einem Vorlauf von 17 std. bei 2° C der pH-Gradient ausgebildet.Jetzt wurde ein Streifen des Gels herausgelöst, mit dem zu untersuchenden Zytosol vermischt und wieder in die Trennkammer eingefüllt.Die Elektrofokussierung wurde für 7 std. bei 2° C fortgesetzt.Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Leistung von 10 W.
Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel in 30 Einzelfraktionen zerlegt und jede mit 3 ml 0,3 mol/l KCl eluiert.Die Gemische wurden 1 1/2 std. bei Zimmertemperatur belassen und anschließend 15 min. zentrifugiert.Im

Überstand wurden die pH-Werte der Einzelfraktionen bestimmt.Außerdem wurde jeweils 1 ml zur Messung der Radioaktivität entnommen.
Zur Auswertung wurde die Radioaktivität und der pH-Wert gegen die dazugehörige Fraktion aufgetragen.

8. Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie

Für die Trennung durch Gelfiltration (Porath,1959) wurde eine Molekularsiebsäule verwendet,die mit einer Suspension poröser Gelkügelchen (Sephadex,ein quervernetztes Dextran) gefüllt wurde.Diese Suspension enthält zwei flüssige Phasen:eine die Gelperlen umgebende und eine in den Gelperlen.Passieren Makromoleküle in Lösung die Säule,so verteilen sie sich zwischen diesen beiden Volumina. Moleküle,die zu groß sind,um in die porösen Gelkugeln einzudringen (z.B. bei Sephadex G 25 der Steroid-Rezeptor-Komplex),werden am schnellsten eluiert,während kleinere Moleküle (z.B. freies Steroid) in die Poren der Gelmatrix eindringen können und erst wesentlich später eluiert werden.
Da Protein-Hormon-Komplexe niedriger Affinität beim Durchwandern der Säule dissoziieren,werden mit dieser Methode nur die hochaffinen Hormon-Rezeptor-Komplexe erfaßt.

Bei der Ionenaustauscherchromatographie dagegen werden Moleküle nach ihrer Nettoladung bei einem bestimmten pH getrennt.Die Probe wird auf eine Säule aufgebracht,die eine Matrix mit bestimmter Ladung enthält.
Sind die Matrixpartikel positiv geladen,so werden positiv geladene Moleküle die Säule ohne Bindung verlassen, während negativ geladene Komponenten der Probe an den Säulenpartikeln durch elektrostatische Wechselwirkung gebunden werden.Die negativ geladenen Komponenten können durch einen Salzgradienten steigender Ionenstärken oder einen pH-Gradienten von der Säule gewaschen werden.
Negativ geladene Ionen des Salzgradienten ersetzen also

die negativ geladenen Probenkomponenten,zuerst die mit der niedrigsten Nettoladung,dann die mit höherer Nettoladung,so daß nacheinander jede negativ geladene Komponente der Probe bei einer spezifischen Ionenkonzentration desorbiert wird.

Zum Quellen wurde Sephadex G 25 (40 g) in Wasser aufgenommen und über Nacht bei 4^{0} C aufbewahrt.Nicht sedimentierte Partikel wurden anschließend dekantiert,das Gel mehrmals in Säulenpuffer (10 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l Mercaptoäthanol, 10% Glycerin, pH 8,3) gewaschen und entgast.
Nach Packen der Säule bei 0-2^{0} C wurde die Gelsuspension wiederum mit Säulenpuffer durchspült und das Zytosol (10 ml),das zuvor mit 5, 10 oder 25 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β inkubiert worden war,vorsichtig auf die Säule aufgebracht.Dann wurde mit dem Säulenpuffer eluiert und Fraktionen von 60 Tropfen gesammelt.
100 µl jeder Fraktion wurden zur Radioaktivitätsmessung eingesetzt.
Mit einem Uvicord (LKB) wurde die Transmission bei 280 nm parallel zur Fraktionierung aufgezeichnet.
Die Fraktionen,die die radioaktiv markierten Makromoleküle enthielten,wurden vereinigt und zur Auftrennung auf die Ionenaustauscher-Säule aufgetragen.

Das Ionenaustauschermaterial (Anionenaustauscher Diäthylaminoäthyl-Zellulose,DE 52 pre-swollen,microgranula) wurde zur Aktivierung in dem 10fachen Volumen (w/v) Säulenpuffer suspendiert und über Nacht bei 4^{0} C aufbewahrt.
Nach dem Dekantieren nicht sedimentierter Partikel wurde die Zellulose erneut in Säulenpuffer aufgenommen und entgast.
Nach Packen der Säule bei 0-2^{0} C wurde das Austauschermaterial solange mit Säulenpuffer gewaschen,bis sich im Eluat der gewünschte pH einstellte.
Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Desaga) wurden 16 ml der nach Sephadex G 25-Gelfiltration gesammelten Makromolekularfraktionen auf die Säule aufgetragen und mit

einem linearen NaCl-Gradienten (bis 0,3 mol/l NaCl) eluiert.
Es wurden Fraktionen von 70 Tropfen mit einer Tropfgeschwindigkeit von 8 Tropfen/min. gesammelt und gleichzeitig die Transmission bei 280 nm mit dem Uvicord (LKB) gemessen.
500 µl jeder Fraktion wurden zur Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt.
Der NaCl-Gehalt wurde mit Hilfe einer Eichgeraden über die Messung der Leitfähigkeit ermittelt.

9. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Die Methode der Dichtegradientenzentrifugation stellt eine Modifikation der von Toft (1966), Korenman (1968 a) und Jensen (1969) ausgearbeiteten Analysetechnik dar.
Bei diesem Verfahren durchwandern die im Zytosol enthaltenen Makromoleküle ein Medium in einem Zentrifugalfeld. Dabei reichern sie sich in Zonen mit Teilchen gleicher Sedimentationsgeschwindigkeit an.
Die Bande der Makromolekularfraktion wird durch den Sedimentationskoeffizienten S beschrieben. Er hat die Dimension einer Zeit und wird in Svedberg-Einheiten S (1 S = 10^{-13} sek.) angegeben.
Die Berechnung der S-Werte erfolgt nach der Gleichung

$$S = \frac{dx}{dt} \times \frac{1}{\omega^2 x}$$

(Schachmann, 1959; DeDuve, 1959; Martin, 1961), wobei w die Winkelgeschwindigkeit des Rotors in U/sek., x die Entfernung vom Rotormittelpunkt bis zu der Bande des zu untersuchenden Moleküls und dx/dt die Wanderungsgeschwindigkeit der Bande darstellt.
Jeweils 500 µl Zytosol wurden mit steigenden Konzentrationen von ^{3}H-Östradiol-17β inkubiert. Korrigiert wurden diese Werte durch Parallelansätze, die zusätzlich unmarkier-

tes DES enthielten.Die Reaktion wurde mit einer Kohlepellet-Behandlung,wie unter B.III.7 beschrieben,gestoppt. 200 µl der jeweiligen Proben wurden auf einen linearen 10-35% (w/w) Saccharose-Dichtegradienten in Tris-Puffer A aufgeschichtet.
Diese Gradienten wurden bei 0° C in einer Beckman Ultrazentrifuge,Typ L5-75,mit einem Spinco SW 60 Titanschwingbecherrotor 16-18 std. bei 56000 U/min. (= 400000 x g) zentrifugiert.Die Böden der Zentrifugenröhrchen wurden anschließend durchstochen,die Gradienten mittels einer konzentrierten Saccharoselösung nach oben gedrückt,jeweils 35-40 Fraktionen in Plastikszintillationsgefäße gesammelt,mit 5 ml Quickszint 212 versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler die Radioaktivität bestimmt. Zur Auswertung wurde die gemessene Radioaktivität gegen die dazugehörige Fraktion aufgetragen.

10. Agargelelektrophorese

Durch die Agargelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung von Hormon-Rezeptor-Komplexen,nicht gebundenem Hormon und an SHBG gebundenem Steroid (Wagner,1972).
Diese Methode beruht darauf,daß der Hormon-Rezeptor-Komplex,der in leicht alkalischem Medium eine negative Ladung trägt und bei niedriger Temperatur relativ stabil ist,im elektrischen Feld zur Anode wandert.Ein endosmotischer Pufferstrom führt dabei freies und unspezifisch gebundenes Hormon zur Kathode.
Die Herstellung der Gelplatten erfolgte mit einer Lösung aus 2,6 g Agar purum und 260 ml Gelpuffer (äquimolare Konzentrationen von Natriumdiäthylbarbiturat und Natriumacetat,Ionenstärke 0,05, pH 8,2).Diese Agarlösung wurde in eine Kammer der Größe 220 x 190 x 5 mm gegossen, 30 min. abgekühlt,in 4 Gelplatten geteilt und diese jeweils auf eine Glasplatte übertragen.In jedes Gel wurden in die Mitte 10 Startlöcher mit einem Durchmesser von 3,5 mm gestanzt.Nach einer Lagerzeit von ca. 24 std. bei

0-2° C in einer feuchten Kammer waren die Gele gebrauchsfertig.
Für diesen Versuch wurden 100 µl-Zytosolansätze verwendet.Die Hormonkonzentration lag bei 10 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17ß.Den kompetierten Werten wurde noch 1 µmol/l unmarkiertes DES zugesetzt.Nach der Inkubation wurden die Proben auf 0-2° C heruntergekühlt und jeweils 50 µl in die Startlöcher gegeben.
Während der 90 min. dauernden Elektrophorese bei 130 mA und 210 V wurde die Temperatur in der Rezeptorregion des Gels mittels eines Minithermistors (Yellow Spring Instrument Part. No. 44202) kontrolliert,auf einem Servogor 2 S Schreiber aufgezeichnet und über ein Colera MC 8 Kühlaggregat auf einen Temperaturbereich von 4-6° C eingestellt.
Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Analysenbahnen voneinander getrennt und jede einzelne in Sektionen von 5 mm geteilt.Jede Sektion wurde in einem Drahtkörbchen,das mit Spezialpapier (BF-Vertriebs GmbH) belegt war,12 std. bei 60° C getrocknet.Die Drahtkörbchen wurden anschließend mit dem getrockneten Gel in Spezialhaltern (BF Vertriebs GmbH) in Glasszintillationsgefäßen (Packard Instrument),in die zuvor 500 µl Aqua dest. pipettiert worden war, aufgehängt.Nachdem die Glasgefäße evakuiert und mit reinem Sauerstoff wieder gefüllt worden waren,wurden sie luftdicht verschlossen und der Inhalt von einem Micromat BF 5010 (BF-Vertriebs GmbH) verbrannt.
Nach Beendigung des Verbrennungsvorganges wurden die Glasgefäße 5 min. bei -10° C abgekühlt,um das bei der Verbrennung entstandene tritiierte Wasser vollständig kondensieren zu lassen (Wegner,1970).Halter und Körbchen wurden entfernt,10 ml Biofluor in jedes Szintillationsgefäß gegeben und die Radioaktivität gemessen.
Zur Auswertung wurde die Radioaktivität gegen die dazugehörige Sektion aufgetragen.

11. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes jedes Zytosols wurde

mittels einer modifizierten Folin-Ciocalteu-Reaktion (Lowry,1951) durchgeführt.
Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden steigende Mengen (5-25 µl) einer 0,1%igen Rinderserumalbumin-Lösung mit Aqua dest. auf 0,1 ml aufgefüllt und mit jeweils 0,5 ml Folin-Gebrauchslösung,bestehend aus 1 ml Kalium-Natrium-Tartrat x 4 H_2O (4%), 1 ml $CuSO_4$ x 5 H_2O (2%) und 98 ml Na_2CO_3 (4%) in 0,2 n NaOH, 10 min. bei 20° C inkubiert. Anschließend wurden 0,1 ml Phenol-Reagenz hinzugegeben, weitere 30 min. bei 20° C inkubiert und dann gegen einen Leerwert,bestehend aus 0,1 ml Aqua dest., 0,5 ml Folin-Gebrauchslösung und 0,1 ml Phenol-Reagenz,der die gleiche Vorbehandlung erfahren hatte,bei 578 nm in einem Eppendorf Photometer 1101 M abgelesen und aus den so ermittelten Werten die Eichkurve gezeichnet.
Die gleiche Behandlung erfuhr 1:100 verdünntes Zytosol, von dem auf diese Weise der Proteingehalt bestimmt wurde. Außerdem wurden entsprechende Leerwerte mit 1:100 verdünntem Puffer mitgeführt.

C. Ergebnisse

I. Stabilität des zytosolischen Östrogenrezeptors

Bei einer vorgegebenen Inkubationstemperatur von 30° C wurde die Stabilität des zytosolischen Östrogenrezeptors untersucht.Dazu wurde zu einer größeren Menge Zytosol soviel radioaktives Hormon hinzugegeben,daß die Endkonzentration 10 nmol/l betrug.Parallel dazu wurde ein NS-Ansatz mit zusätzlich unmarkiertem Hormon (Endkonzentration 1 µmol/l) hergestellt.
Bestimmt wurde die spezifische Hormon-Rezeptor-Bindung nach verschiedenen Inkubationszeiten.

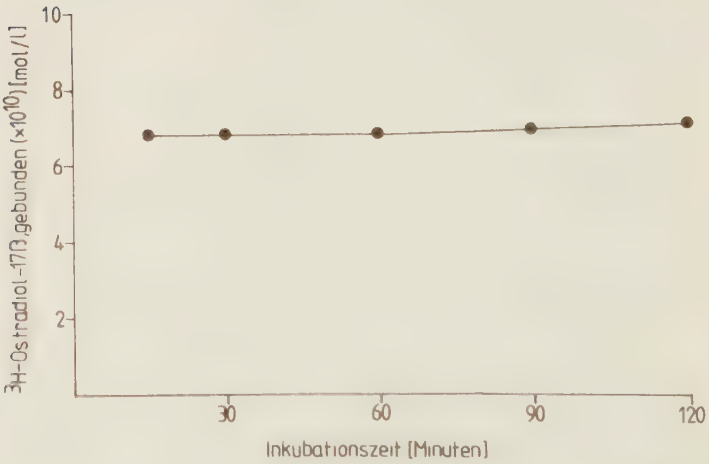

Abbildung 2 : Stabilität des zytosolischen Östrogenrezeptors aus menschlichem Uterusgewebe.Hormonkonzentrationen:10 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β ± 1 µmol/l DES.Inkubationstemperatur:30°C.Inkubationsdauer:15-120 min.

Aus Abbildung 2 ist ersichtlich,daß bereits nach 15 min. ein Plateau der Kurve erreicht ist,das sich auch im weiteren Verlauf des Versuchs nicht mehr ändert.Dieses Plateau entspricht dem Bindungsgleichgewicht.
Als optimale,gut praktikable Inkubationszeit wurden daher auf der Grundlage dieses Experiments 60 Minuten gewählt. Eine Ausnahme stellen lediglich die Experimente zur Messung der Assoziations- und Dissoziationskinetik dar.

II. Scatchardanalyse

1. Uterus des Menschen

Für diese Analyse wurde das Zytosol mit steigenden Konzentrationen von ^{3}H-Östradiol-17β titriert.Die Ansätze für die nichtspezifische Bindung enthielten zusätzlich unmarkiertes DES.Nach Kohlebehandlung und Messung der Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler wurden die erhaltenen Ergebnisse nach der Methode von Scatchard (1949) ausgewertet.Aus diesen Gleichgewichts-Bindungsdaten ist es möglich,die scheinbare Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante der Hormon-Rezeptor-Komplexe zu berechnen und die molare Konzentration des Rezeptors zu bestimmen.
Nach dem Auftragen der Quotienten aus spezifisch gebundenem ^{3}H-Östradiol-17β zu freiem tritiiertem Hormon (Ordinate) gegen die jeweilige spezifisch gebundene ^{3}H-Östradiol-17β-Konzentration (Abszisse) ergab sich aus der Verbindungslinie der Punkte (Scatchard-Plot) überraschenderweise keine Gerade.Vielmehr kristallisierten sich zwei sehr unterschiedliche Kurvenverläufe heraus.
Betrachtet man nun zunächst die Abbildung 3a,so sieht man als Einschub rechts oben die ursprüngliche Titrationskurve.Sie hat einen inhomogenen Verlauf mit einem Einbruch, der im konkreten Fall bei 15 nmol/l liegt.Es besteht der Verdacht,daß die Bindung an zwei verschiedene Klassen von Bindungskomponenten sich gegenseitig überlagert.
Nach diesem uneinheitlichen Verlauf der Titrationskurve ist für den Scatchard-Plot keine Gerade zu erwarten.Der Scatchard-Plot zeigt vielmehr einen nach oben konkaven Kurvenverlauf mit einem ersten steilen und einem zweiten flachen Anteil.
Geht man davon aus,daß zwei Bindungsklassen mit unterschiedlicher Affinität und Kapazität vorhanden sind,kann der Scatchard-Plot wie folgt interpretiert werden:Den ersten steilen Kurvenabschnitt prägt eine Kategorie von Hormonbindern mit hoher Affinität und geringer Bindungska-

pazität.Der zweite flache Kurvenabschnitt repräsentiert überwiegend die zweite Klasse von Östrogenbindern mit vergleichsweise geringer Affinität und hoher Kapazität.

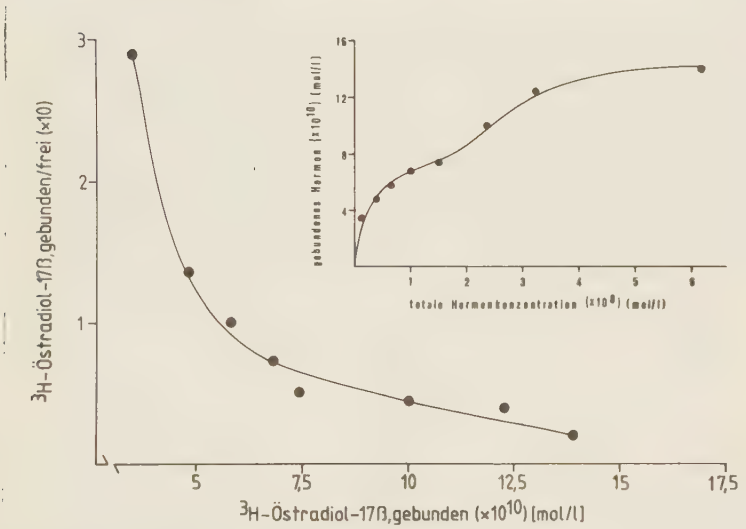

Abbildung 3a

Abbildung 3a und 3b : Ergebnisse typischer Scatchardanalysen für Östrogenrezeptoren im menschlichen Uteruszytosol.Die Einschübe zeigen die dazugehörigen Titrationskurven.Hormonkonzentration:1-60 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β ± 1 µmol/l DES.Inkubationstemperatur:30°C.Inkubationsdauer: 1 std.

Die mathematische Auflösung der konkaven Kurve in die beiden homogenen Bindungsklassen wurde nach einer Modifikation der Methode von Berson & Yalow (1959) durchgeführt.Für die erste hochaffine Kategorie von Bindungsstellen ließ sich danach eine scheinbare Dissoziationskonstante von 1,2 x 10^{-10} mol/l und eine maximale Rezeptorkonzentration von 37,2 fmol/mg Zytosolprotein ermit-

teln.Für die zweite Klasse von Östrogenbindern lag dagegen die Dissoziationskonstante bei 2,5 x 10^{-8} mol/l.Die maximale Rezeptorkonzentration betrug 160,5 fmol/mg Protein.
Im allgemeinen ließ sich für die erste hochaffine Kategorie von Bindungsstellen eine scheinbare Dissoziationskonstante von 0,7-2,6 x 10^{-10} mol/l und eine maximale Rezeptorkonzentration von 8,7-52,5 fmol/mg Zytosolprotein ermitteln.Für die zweite Klasse von Östrogenbindern lag die Dissoziationskonstante bei 2,5-5,9 x 10^{-8} mol/l.Die maximale Rezeptorkonzentration betrug 88,5-160,5 fmol/mg Protein.

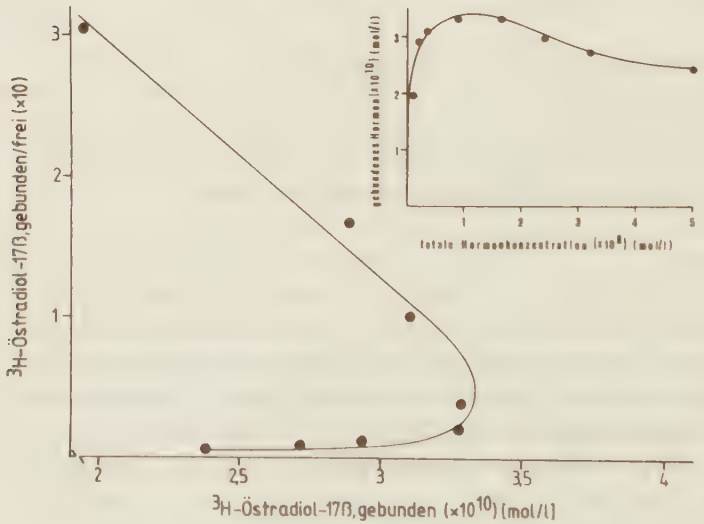

Abbildung 3b

Wendet man sich nun der Abbildung 3b zu,so erkennt man wiederum als Einschub rechts oben die ursprüngliche Titrationskurve.Sie zeigt einen gleichmäßigen Verlauf ohne Einbrüche mit einem Maximum bei etwa 15 nmol/l.Anschließend wird eine Abnahme der spezifischen Bindung deutlich.

Der dazugehörige Scatchard-Plot zeigt eine Kurve,die in ihrem ersten Abschnitt steil verläuft,dann jedoch flach zur linken Seite wegknickt.Das bedeutet,wie auch aus der Titrationskurve zu ersehen ist,daß bei höheren Hormonkonzentrationen (20-25 nmol/l) die spezifische Bindung wieder abnimmt.Es ist möglich,daß es sich hierbei um ein Artefakt handelt.
Für den ersten steilen Kurvenabschnitt konnte eine Dissoziationskonstante von $5,9 \times 10^{-10}$ mol/l und eine maximale Rezeptorkonzentration von 53,6 fmol/mg Zytosolprotein ermittelt werden.
Im allgemeinen betrug die Dissoziationskonstante für den ersten steilen Kurvenabschnitt $1,3\text{-}6,7 \times 10^{-10}$ mol/l und die maximale Rezeptorkonzentration 33,7-127,4 fmol/mg Protein.

2. Uterus der Ratte

Die Scatchardanalysen am menschlichen Uterus wurden durch entsprechende Experimente am Rattenuterus ergänzt.
Als Einschub rechts oben in der Abbildung 4 sieht man die eigentliche Titrationskurve.Sie zeigt einen steilen,raschen Anstieg bis etwa 10 nmol/l und dann einen plateauartigen Verlauf.
Beim Scatchard-Plot erkennt man eine steil verlaufende Kurve mit einem geringen Knick nach links.Der Kurvenverlauf ist also ähnlich wie beim menschlichen Uterus in Abbildung 3b.Jedoch ist die Reduktion der spezifischen Bindung nicht so ausgeprägt wie beim menschlichen Gewebe.
Die scheinbare Dissoziationskonstante für den steilen Kurvenabschnitt lag bei $8,0 \times 10^{-10}$ mol/l.Die maximale Rezeptorkonzentration betrug 200,0 fmol/mg Zytosolprotein.
Im allgemeinen ließ sich für den steilen Kurvenabschnitt eine Dissoziationskonstante von $0,8\text{-}3,3 \times 10^{-9}$ mol/l und eine maximale Rezeptorkonzentration von 197-333 fmol/mg Protein ermitteln.

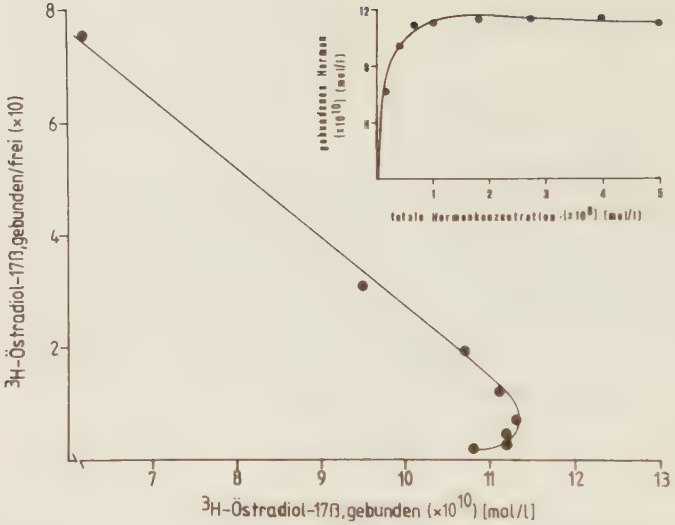

Abbildung 4 : Ergebnis einer typischen Scatchardanalyse für Östrogenrezeptoren im Zytosol von Rattenuteri.Der Einschub zeigt die dazugehörige Titrationskurve.Hormonkonzentration:1-50 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17ß ± 1 µmol/l DES. Inkubationstemperatur:30°C.Inkubationsdauer:1 std.

III. Assoziations- und Dissoziationskinetik

Die Reaktionskinetik wurde bei einer Hormonkonzentration von 10 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β durchgeführt. Die nichtspezifischen Ansätze enthielten zusätzlich einen 100fachen Überschuß an unmarkiertem DES.

1. Assoziation

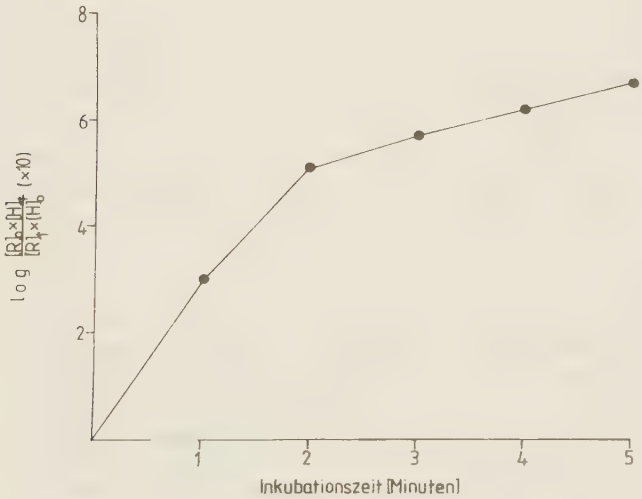

Abbildung 5 : Darstellung der Assoziationskinetik für Östrogenrezeptoren im menschlichen Uteruszytosol. Hormonkonzentration: 10 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β ± 1 µmol/l DES. Inkubationstemperatur: 30°C. Inkubationsdauer: 1-5 min.

Abbildung 5 zeigt eine Assoziationskurve, die zunächst steil ansteigt, sich dann jedoch rasch abflacht.
Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante berechnet sich aus dem ersten steilen Anstieg zu K_1 = 9,5 x 10^5 (l x mol^{-1} x sec^{-1}).

2. Dissoziation

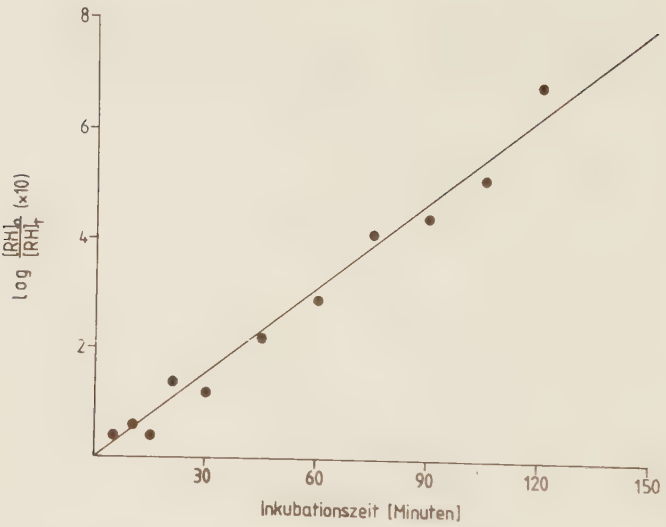

Abbildung 6 : Darstellung der Dissoziationskinetik für Östrogenrezeptoren im menschlichen Uteruszytosol.Hormonkonzentration:10 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β ± 1 µmol/l DES. Vorinkubation:1 std. bei 30°C.Teilung des unkompetierten Zytosols.Der eine Teil blieb unbehandelt (Kontrollwerte),dem anderen Teil wurde 1 µmol/l DES zugesetzt (Hauptwerte).Weiterinkubation aller Zytosole:5-150 min. bei 30°C.

Wie aus der Abbildung 6 zu ersehen ist,liegt bei der Dissoziation ein monophasischer Kurvenverlauf vor.
Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante beträgt K_2 = $2{,}0 \times 10^{-4}$ (sec^{-1}).
Sowohl die Assoziationskinetik als auch die Dissoziationskinetik liefert keine Hinweise auf das Vorliegen mehrerer Klassen von Steroidbindern deutlich unterschiedlicher Affinität.

3. Ermittlung der scheinbaren Dissoziationskonstanten aus den kinetischen Daten

Für die Dissoziationskonstante, ermittelt aus den Ergebnissen der Reaktionskinetik, gilt:

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{2{,}0 \times 10^{-4} \left[\text{sec}^{-1}\right]}{9{,}5 \times 10^{5} \left[\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{sec}^{-1}\right]} = 2{,}1 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$$

Die Dissoziationskonstante für die hochaffine Komponente im biphasischen Scatchard-Plot (Abbildung 3a) lag bei $1{,}2 \times 10^{-10}$ mol/l. Für die Hauptkomponente im monophasischen Scatchard-Plot (Abbildung 3b) betrug die Dissoziationskonstante $5{,}9 \times 10^{-10}$ mol/l.
Die scheinbaren Dissoziationskonstanten aus den Gleichgewichtsdaten werden durch das Ergebnis der kinetischen Daten bestätigt.

IV. Spezifitätsanalyse

In diesen Versuchen erfolgte eine gleichzeitige Inkubation mit radioaktiv markiertem Hormon und den jeweiligen unmarkierten Kompetitoren.
Jeweils 200 µl Zytosol wurden mit steigenden Konzentrationen von ^{3}H-Östradiol-17β inkubiert, entweder allein oder zusammen mit 1 µmol/l der unmarkierten Kompetitoren.

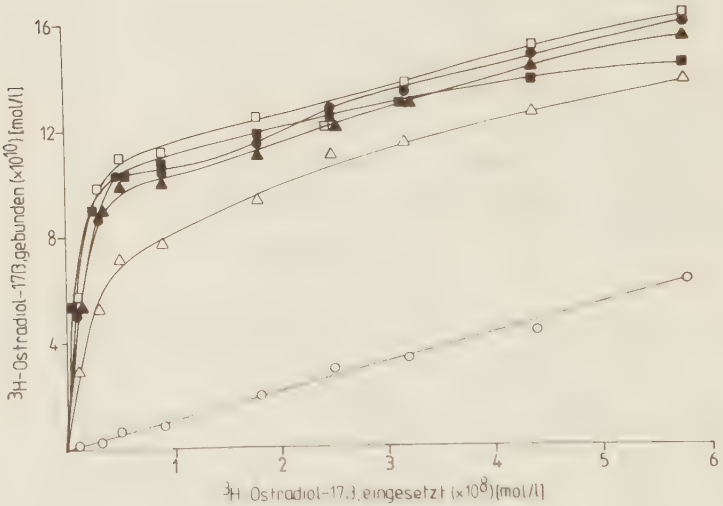

Abbildung 7 : Kompetitionsstudie für Östrogenrezeptoren im menschlichen Uteruszytosol. Hormonkonzentration: 1-60 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β ± 1 µmol/l der unmarkierten Kompetitoren. Inkubationstemperatur: 30°C. Inkubationsdauer: 1 std. (●—● unkompetiert, ○—○ DES, □—□ Testosteron, △—△ Progesteron, ■—■ Dexamethason, ▲—▲ Aldosteron).

In Abbildung 7 ist die Spezifität der Steroidbindung in Abhängigkeit von der Konzentration an radioaktiv markiertem ^{3}H-Östradiol-17β dargestellt.
DES, ein synthetisches Östrogen, erweist sich als starker

Kompetitor.Die ^{3}H-Östradiol-17ß-Bindung ist niedrig und der Kurvenverlauf nahezu linear.Testosteron,Aldosteron und Dexamethason beeinflussen dagegen die Bindung des radioaktiv markierten Hormons kaum.Lediglich Progesteron zeigt eine Kreuzreaktion,die eventuell auf eine antiöstrogene Aktivität der Gestagene zurückzuführen ist.
Daß die Kompetition des Progesterons zu den hohen ^{3}H-Östradiol-17ß-Konzentrationen hin abnimmt,liegt vermutlich daran,daß der Überschuß des nicht markierten Kompetitors gegenüber dem radioaktiven Hormon geringer wird.
Die Spezifität der Steroidbindung hat über den gesamten Kurvenverlauf einen gleichbleibenden Charakter,was dafür sprechen würde,daß es sich um nur eine Klasse von Bindungskomponenten handelt.

V. Untersuchungen zur chemischen Natur der Östrogen-Bindungsstellen

In diesen Versuchen wurden für die totale Bindung jeweils 200 µl Zytosol mit steigenden Konzentrationen ^{3}H-Östradiol-17β versetzt.Die Ansätze für die nichtspezifische Bindung enthielten neben dem radioaktiv markierten Hormon noch unmarkiertes DES.Nach der Inkubation wurden die Proben 30 min. bei 0° C abgekühlt.Anschließend wurden die Enzyme (1,25 mg/ml Zytosol) bzw. der SH-Blocker (10 mmol/l) zugegeben und die Proben für 30 min. bei 0° C inkubiert.

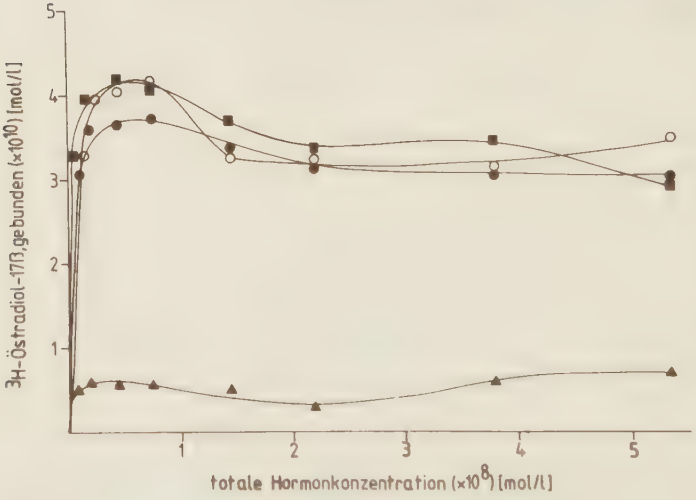

Abbildung 8 : Untersuchungen zur chemischen Natur der Östrogen-Bindungsstellen.Hormonkonzentration:1-55 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β ± 1 µmol/l DES.Inkubationstemperatur: 30°C.Inkubationsdauer:1 std.Danach Zugabe der Enzyme: Konzentration:1,25 mg/ml Zytosol.Inkubationstemperatur: 0°C.Inkubationsdauer:30 min. (●—● ohne Enzym,■—■ Thermolysin,○—○ neutrale Protease,▲—▲ Pronase).

Abbildung 8 zeigt die Veränderungen der spezifischen Bindung durch Zugabe von bestimmten Enzymen in Abhängigkeit von der Konzentration an radioaktiv markiertem ^{3}H-Östradiol-17β.
Gegenüber Thermolysin und neutraler Protease ist der zytosolische Östrogenrezeptor unempfindlich,d.h. die spezifische Bindung bleibt in vollem Umfang erhalten.
Der scheinbare Anstieg der Bindungskapazität nach Enzymzugabe ist statistisch nicht signifikant und liegt innerhalb der Schwankungsbreite des Nachweisverfahrens.
Durch Pronase jedoch wird die Struktur der Bindungsstellen so verändert,daß nur noch eine geringe spezifische Bindung möglich ist.
Der Einfluß der Enzyme auf die spezifische Bindung ist offensichtlich in Gegenwart niedriger und hoher Hormonkonzentrationen gleich.
Nicht gezeigt sind hier die Untersuchungen mit SH-Gruppen blockierenden Substanzen.Es war zu beobachten,daß die Effektivität der p-Chloromercuriphenylsulfonsäure ebenfalls über den gesamten Titrationsbereich unverändert blieb.Die spezifische Bindung wurde dabei um etwa 60% reduziert.
Die Ergebnisse dieser Experimente weisen ebenfalls darauf hin,daß es sich bei dem Östrogenbinder im menschlichen Uteruszytosol um nur eine einheitliche Bindungskomponente handelt.

VI. Isoelektrische Fokussierung

Dieser Versuch wurde vergleichend mit einer niedrigen (5 nmol/l) und einer hohen (25 nmol/l) Hormonkonzentration durchgeführt,um die auf Grund der Abbildung 3a postulier-

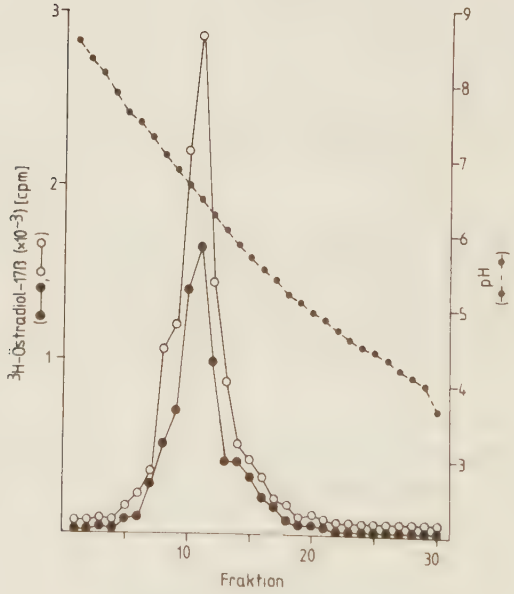

Abbildung 9 : Auftrennungsprofil einer isoelektrischen Fokussierung von Östrogenrezeptoren im menschlichen Uteruszytosol.Hormonkonzentration:5 oder 25 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β.Inkubation:16 std. bei 0°C.Vorlauf:17 std. bei 2°C.Auftrennung:7 std. bei 2°C.pH-Bereich:3,5-10. (●—● 5 nmol/l,○—○ 25 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β, -•---• pH-Gradient).

ten zwei Bindungskomponenten eventuell durch ein unterschiedliches Verhalten im pH-Gradienten zu erfassen.
So bestand z.B. die Vorstellung,daß durch die Zugabe von 25 nmol/l radioaktiv markiertem Hormon zum Zytosol das Östrogen sowohl an die erste,hochaffine als auch an eine zweite,geringer affine Komponente gebunden wird und sich dann zwei Peaks mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten zeigen.
Wie Abbildung 9 demonstriert,kann man jedoch in beiden Fällen nur einen einzigen Peak erkennen.Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 6.45,also in einem leicht sauren Bereich.
Die deutliche Anreicherung der Aktivität im leicht sauren Rezeptorbereich ist vollständig kompetierbar (keine Abbildung).

VII. Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie

Auch mit diesen Experimenten wurde versucht,den Östrogenbinder des menschlichen Uterus in seine angenommenen zwei

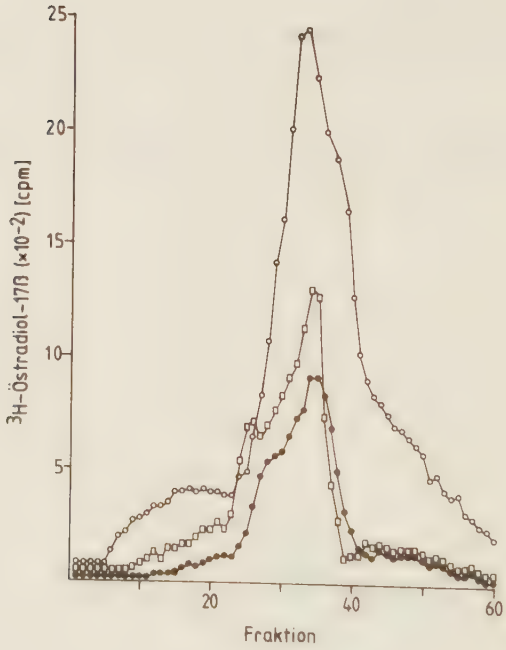

Abbildung 10 : Ionenaustauscherchromatographie des Östrogenbinders im menschlichen Uteruszytosol.Hormonkonzentration:5, 10 oder 25 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β.Inkubationstemperatur:30^{0}C.Inkubationsdauer:1 std.Primär Gelfiltration mit Sephadex G 25 bei 0^{0}C.Anschließend Ionenaustauscherchromatographie mit DE 52 bei 0^{0}C.Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten über 8-9 std. (●—● 5 nmol/l, □—□ 10 nmol/l,○—○ 25 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β).

Komponenten (siehe Abbildung 3a) aufzutrennen.Dazu wurde das Zytosol mit unterschiedlichen Konzentrationen des radioaktiv markierten Hormons (5, 10 und 25 nmol/l) inkubiert.
Zunächst wurde eine Gelfiltration auf einer Sephadex G 25-Säule durchgeführt,um das freie Steroid zu entfernen.Die an Makromoleküle gebundene Radioaktivität wurde jeweils als scharfer Peak in den ersten Fraktionen von der Säule eluiert (keine Abbildung).Diese Fraktionen wurden gesammelt und zur weiteren Auftrennung auf eine Ionenaustauschersäule (DE 52) aufgetragen.
Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten.
Wie aus Abbildung 10 zu ersehen ist,zeigt sich bei allen Hormonkonzentrationen ein einziger Peak,der bei einer NaCl-Konzentration von 50-190 mmol/l von der Säule eluiert wird.

Die sich bei einem Teil der Scatchard-Plots abzeichnende zweite Bindungskomponente läßt sich auch mit den Methoden der isoelektrischen Fokussierung und der Ionenaustauscherchromatographie nicht verifizieren.

VIII. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Für diese Untersuchungen wurde das Zytosol nach der Inkubation auf einen linearen (10-35%) Saccharose-Gradienten aufgetragen.

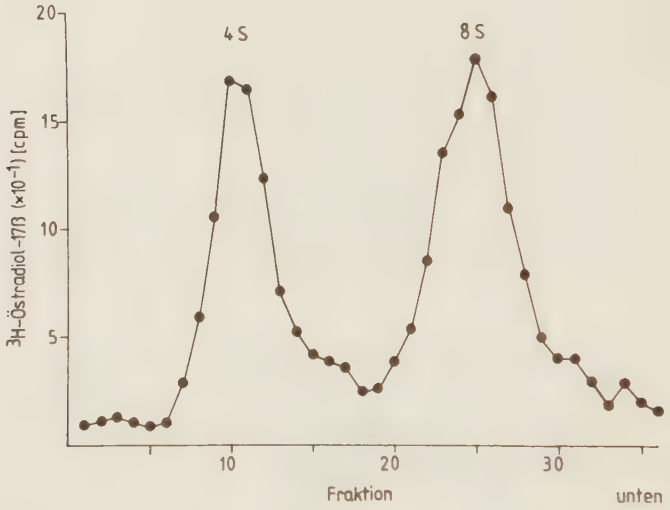

Abbildung 11 : Sedimentationsprofil der ^{3}H-Östradiol-17β bindenden Komponenten im menschlichen Uteruszytosol.Hormonkonzentration:1 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β.Inkubationstemperatur:0°C.Inkubationsdauer:6 std.Linearer 10-35% Saccharose-Gradient.Zentrifugationsbedingungen:SW 60, 400 000 x g, 0°C, 16-18 std.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch ein solches Sedimentationsprofil.Es finden sich zwei annähernd gleich hohe Aktivitätpeaks,deren Sedimentationskonstanten mit etwa 4S und 8S bestimmt wurden.
Weitergehende Überlegungen führten dazu,daß das Zytosol vor der Zentrifugation in der üblichen Weise titriert

wurde und anschließend die 4S- und 8S-Bereiche getrennt nach der Methode von Scatchard (1949) ausgewertet wurden. Es ergaben sich jeweils gleiche Kurvenverläufe für den 4S- und 8S-Bereich: $K_{D\ 4S} \approx K_{D\ 8S} \approx 2{,}0 \times 10^{-9}$ mol/l (keine Abbildung).

IX. Agargelelektrophorese

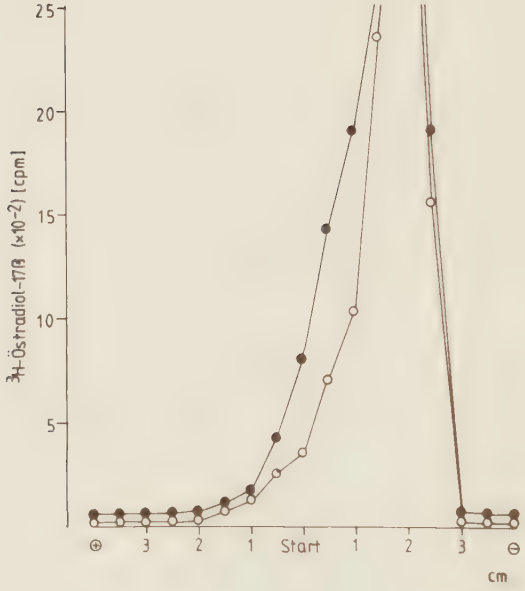

Abbildung 12a

Abbildung 12 : Elektrophoretische Auftrennung der ^{3}H-Östradiol-17β bindenden Komponenten
a) aus menschlichem Uteruszytosol
b) aus Rattenuteruszytosol
Hormonkonzentration: 10 nmol/l ^{3}H-Östradiol-17β ± 1 µmol/l DES. Inkubationstemperatur: 30°C. Inkubationsdauer: 1 std. Auftrennungsbedingungen: 4-6°C, 90 min., 210 V, 130 mA. (●—● totale Bindung, ○—○ nichtspezifische Bindung).

Auch diese Analysen gingen von der Hypothese des Zwei-Komponenten-Systems (siehe Abbildung 3a) aus.Beabsichtigt war eine Inkubation des menschlichen Uteruszytosols mit verschiedenen Hormonkonzentrationen,um so gegebenenfalls unterschiedliche Auftrennungsprofile im elektrischen Feld zu erhalten.
Jedoch zeigte sich schon nach den ersten Versuchen,daß diese Methode für eine Auftrennung der ^{3}H-Östradiol-17β bindenden Komponenten nicht geeignet ist.Vielmehr bildete sich in allen Experimenten nur ein einziger,etwas verbreiterter Peak in Richtung zur Kathode aus (Abbildung 12a).

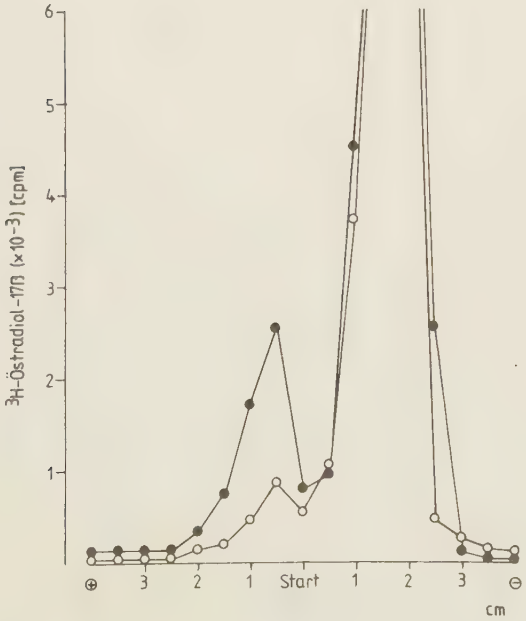

Abbildung 12b

Daher wurde dieser Versuch vergleichend mit Rattenuteruszytosol durchgeführt.Wie man auf der Abbildung 12b erkennt,findet man bei der Auftrennung einen hohen,kompetierbaren Aktivitätspeak in der typischen Rezeptorregion (in Richtung der Anode) sowie einen weiteren Peak (in Richtung der Kathode),der die freien und unspezifisch gebundenen Steroide repräsentiert.

D. Diskussion

Meine Beobachtungen über das Erreichen des Bindungsgleichgewichts und die Stabilität des Östrogen-Rezeptor-Komplexes bei einer Inkubationstemperatur von 30°C decken sich mit den Ergebnissen von Mester (1970),der für den Kaninchenuterus beschreibt,daß das Äquilibrium innerhalb von 30 min. erreicht wird und über mehrere Stunden erhalten bleibt.Nach seinen Beobachtungen sind die Hormon-Rezeptor-Komplexe im Uteruszytosol des Menschen und der Ratte etwas labiler,Gleichgewichtsstudien sind dennoch durchführbar.
Besonders wichtig ist das Arbeiten im Äquilibrium für die Scatchard-Analytik.Die sehr unterschiedlichen,jedoch gut reproduzierbaren Ergebnisse dieser Methode geben zu den nun folgenden Überlegungen Anlaß.

I. Der Kurvenverlauf der Abbildung 3a (s.C.II.1) läßt folgende Interpretationsmöglichkeiten zu:
   1. Es liegt eine negative Kooperativität zwischen gleichartigen Bindungsstellen vor.Durch das allmähliche Besetzen aller Bindungsstellen mit Hormonmolekülen kommt es zu einer zunehmenden Erschwerung der weiteren Hormonbindung mit einem entsprechenden Ansteigen der scheinbaren Dissoziationsrate.Eine durch spezifische Liganden bedingte Konformationsänderung am bindenden Molekül und eine daraus folgende Abnahme der spezifischen Bindung findet sich in zahlreichen Enzymsystemen (Levitzki, 1969).Ähnliche Beobachtungen gibt es aber auch in hormonellen Systemen,z.B. beim Acetylcholinrezeptor (Eldefrawi,1972) und beim Insulinrezeptor (De Meyts,1973).
   2. Es liegen zwei oder mehr Klassen von Bindungskomponenten vor:Eine Kategorie von Hormonbindern mit hoher Affinität und geringer Kapazität sowie eine zweite Kategorie von Östrogenbindern mit vergleichsweise geringer Affinität und hoher Kapazität.Eine

solche Situation beschreibt Eriksson (1978) für den Rattenuterus.Er sieht die Bedeutung der zweiten, niederaffinen Komponente,die nicht transloziert wird,darin,daß sie das Östrogen im Uterus zurückhält und so eine östrogenreiche Umgebung für die erste Komponente schafft,die in den Kern übertragen werden kann.In meinen Experimenten konnte ich allerdings eine solche zweite Komponente für den Rattenuterus nicht erkennen.

Man könnte nun auch der Meinung sein,daß die zweite Bindungskomponente aus dem Serum stammt und daß die Größe ihres Vorhandenseins vom unterschiedlichen Blutgehalt des jeweils untersuchten Gewebes abhängig ist.Um diese Frage zu überprüfen,wurde das Serum mehrerer weiblicher Patientinnen mit ^{3}H-Östradiol-17β titriert und mit DES kompetiert,wobei DES nicht an SHBG (Sexualhormon bindendes Globulin) bindet (King,1974).Dabei wurde festgestellt,daß trotz der Anwesenheit von SHBG keine spezifische Bindung nachweisbar ist.

Es stellt sich die Frage,warum diese vermeintliche zweite Komponente in meinen anderen Untersuchungen nicht darstellbar ist.Dazu folgende Überlegungen: In Kurzzeitexperimenten,wie z.B. der Initialphase der Assoziationskinetik,ist das Hormon auf Grund der geringen Affinität des Binders noch nicht gebunden;in Langzeitstudien,wie isoelektrische Fokussierung,Ionenaustauscherchromatographie,Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation,ist das Östrogen wegen der niedrigen Affinität des Binders möglicherweise schon wieder abdissoziiert.Ähnliches wurde beispielsweise auch von Bojar (1980 b) beim Bronchialkarzinom beobachtet.

II. Der Scatchard-Plot der Abbildung 3b (s.C.II.1) läßt ebenfalls an eine negative Kooperativität denken,obwohl sich dieser Kurvenverlauf deutlich von denen unterscheidet,die De Meyts (1973) oder Eldefrawi (1972) für solche Interaktionen angeben.Diese Differenz läßt

sich eventuell durch folgendes Modell erklären:
De Meyts geht von Molekülen mit mehreren,primär gleichartigen Bindungsstellen aus.Durch allmähliches Besetzen aller Bindungsstellen kommt es zu kontinuierlichen Veränderungen am Proteinmolekül und damit zu einer kontinuierlichen Abnahme der Affinität.

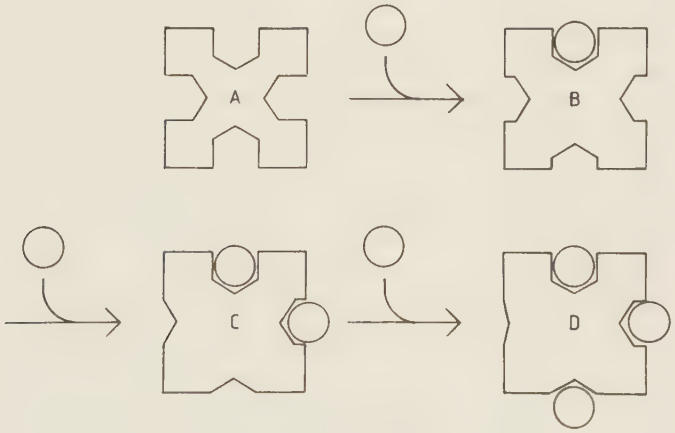

Abbildung 13 : Modellvorstellung zur negativen Kooperativität des Insulinrezeptors
Zur Vereinfachung der Darstellung sind im.Modell,abweichend von der Situation in der Plasmazellmembran, nur 4 Bindungsstellen eingezeichnet.
A : Gleichartige Rezeptorstellen vor Bindung des Hormons
B,C,D : Nach sukzessiver Bindung von Hormonmolekülen reduziert sich zunehmend die Affinität der freien Bindungsstellen

Für meine Analysen postuliere ich Proteinmoleküle

mit e i n e r hochaffinen und mehreren geringer affinen Bindungsstellen.Zunächst werden die hochaffinen Bindungsstellen besetzt.Erhöht man darüber hinaus die Hormonkonzentration,so kommt es auch zu einer Bindung an die geringer affinen Bindungsstellen und damit zu einer negativen Beeinflussung der hochaffinen Bindungsstellen mit einer Abnahme der spezifischen Bindung.

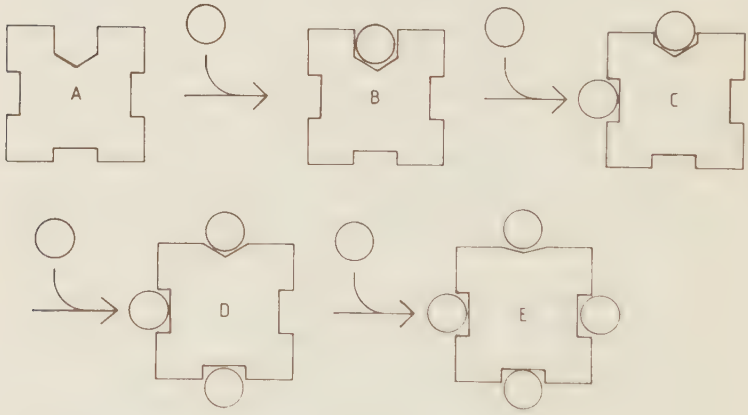

Abbildung 14 : Modellvorstellung zur negativen Beeinflussung der spezifischen Östrogen-Rezeptor-Bindung in Gegenwart hoher Hormonkonzentrationen

A : Ausgangssituation:Der Rezeptor verfügt über eine hochaffine spezifische Bindungsstelle und mehrere niederaffine Bindungsorte

B : Bindung des Hormons an die hochaffine spezifische Bindungsstelle

C,D,E : Nach sukzessiver Bindung von Hormonmolekülen an die niederaffinen Bindungsorte reduziert sich zunehmend die Affinität der spezifischen Bindungsstelle

Da durch die Inkubation mit Dextrankohle das Hormon von den niederaffinen Bindungsstellen abdissoziiert und an die Dextrankohle adsorbiert wird,kommt es somit zu einer Abnahme der Gesamtbindung.

Bojar (1980 c) beschreibt Kurvenverläufe,wie in Abbildung 3b gezeigt,auch für das Mammakarzinom.

Einige Autoren haben bei Scatchard-Analysen auch positive Kooperativität beobachtet.So beschreibt Erdos (1971) für den Kalbsuterus eine solche Interaktion zwischen den Bindungsstellen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.Puca (1971) findet,ebenfalls im Kalbsuterus,eine positive Kooperativität bei Östradiolkonzentrationen $<$ 0,25 nmol/l.Legt man Normalwerte für Östradiol im menschlichen Serum zugrunde (11-560 pg/ml,abhängig von der Zyklusphase),so dürfte es sich bei 0,25 nmol/l (= 68 pg/ml) um einen Wert im unteren Normbereich handeln.Eriksson (1978) zeigt für eine dritte Kategorie von Bindungsstellen,die nur im Kern vorkommt,ein kooperatives Verhalten auf.
Ich habe solche Effekte nicht beobachtet,was eventuell damit zusammenhängt,daß ich mit Hormonkonzentrationen $>$1 nmol/l gearbeitet habe.
Es stellt sich allerdings auch die Frage,ob es sich hierbei um eine echte positive Kooperativität handelt.In Gegenwart niedriger Östrogenkonzentrationen ist der Rezeptor unstabiler als bei höheren Hormonkonzentrationen.Dieses Verhalten kann zu einem initialen Anstieg im Scatchard-Plot führen und damit eine positive Kooperativität vortäuschen.
Eine endgültige Klärung all dieser Probleme wird jedoch erst die Reinigung des Rezeptorproteins bringen,was auch in Zukunft das Ziel der Forschung sein wird.
Die scheinbare Dissoziationskonstante des ^{3}H-Östradiol-17β-Rezeptor-Komplexes im menschlichen Uteruszytosol errechnete sich für die hochaffine Komponente im biphasischen Scatchard-Plot (Abbildung 3a) und die Hauptkomponente im monophasischen Scatchard-Plot (Abbildung 3b) zu $0,7\text{-}6,7 \times 10^{-10}$ mol/l.Ähnliche Werte werden von anderen Autoren für verschiedene Zielorgane angegeben:für das Mam-

magewebe der Ratte (8×10^{-10} mol/l;Wittliff,1972),das menschliche Mammakarzinom (9×10^{-10} mol/l;Wittliff,1971; 1×10^{-10} mol/l;McGuire,1977),den Rattenuterus (8×10^{-10} mol/l;Eriksson,1978),den Kalbsuterus ($2,9-6,7 \times 10^{-10}$ mol/l;Puca,1971) und den Hamsteruterus ($0,9 \times 10^{-10}$ mol/l; Steggles,1972).Durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden,die die verschiedenen Verfasser benutzten,können die gefundenen Werte natürlich nicht identisch sein.
Die Östrogen-Rezeptor-Konzentration des menschlichen Uterus erreichte für die oben genannten Komponenten Werte von 8-130 fmol/mg Zytosolprotein.Für andere Zielorgane finden sich ähnliche Angaben:Mammagewebe der Ratte (15-50 fmol/mg;Wittliff,1972),menschliches Mammakarzinom (10-138 fmol/mg;Wittliff,1971),Rattenuterus (200-350 fmol/mg;eigene Messungen) und Hamsteruterus (300 fmol/mg;Steggles, 1972).Alle genannten Werte bewegen sich also im Bereich einer Größenordnung und müssen,da sie von den verschiedenen Arbeitsgruppen durch unterschiedliche Methoden ermittelt wurden,als vergleichbar angesehen werden.
Die von mir für die geringer affine Komponente im biphasischen Scatchard-Plot (Abbildung 3a) ermittelte scheinbare Dissoziationskonstante ($2,5-5,9 \times 10^{-8}$ mol/l) korreliert gut mit den Ergebnissen von Eriksson (1978) und Michel (1974) für den Rattenuterus:$3,3 \times 10^{-8}$ mol/l bzw. 1×10^{-8} mol/l.
Alle weiteren Untersuchungen wurden durchgeführt,um eine eventuell vorhandene zweite Bindungskomponente im Östrogen-Rezeptor-System des menschlichen Uterus nachzuweisen und zu differenzieren.
Sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsreaktion zeigen in meinen Experimenten einen monophasischen Kurvenverlauf und geben damit keinen Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Klassen von Steroidbindern deutlich unterschiedlicher Affinität.Dies entspricht auch den Ergebnissen von Alberga (1970) für den Kalbsuterus,während Best-Belpomme (1970) und Sanborn (1971) für die Östradiol-Rezeptor-Bindung im uterinen Zytosol von Kalb und Kaninchen eine biphasische Dissoziationskinetik fanden.

Die von mir berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation lassen sich mit den Werten vergleichen,die von den oben genannten Autoren berichtet werden.Dabei korreliert die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante besser mit der Konstanten,die in der biphasischen Dissoziationskinetik für die schnellere Reaktion ermittelt wurde.Es ist jedoch zu berücksichtigen,daß die Konstanten,die aus Reaktionen in komplexen biologischen Systemen,wie zytosolischen Organpräparationen,ermittelt werden,nur als approximativ angesehen werden können.
In meinen Experimenten werden die scheinbaren Dissoziationskonstanten aus den Gleichgewichtsdaten durch das Ergebnis der kinetischen Daten bestätigt.Bei anderen Autoren finden sich weniger gute Übereinstimmungen.Nach Riesner (1980) müssen bestimmte methodische Voraussetzungen erfüllt sein,um eine gute Korrelation der verschiedenen Daten zu erhalten.Und zwar gibt er an,daß man bei den kinetischen Untersuchungen mindestens dreimal soviel Hormon zugeben muß,wie die aus den Gleichgewichtsstudien ermittelte Dissoziationskonstante beträgt.
Die Untersuchungen zur Spezifität und zur chemischen Natur der Östrogen-Bindungsstellen sprechen ebenfalls dafür, daß es sich bei den Östrogenbindern um nur eine Klasse von Bindungskomponenten handelt.
Die Kreuzreaktion des Progesterons mit dem Östrogen-Rezeptor im menschlichen Uterus beträgt in meinen Analysen maximal 40%,was von McGuire (1977) als "mäßig" bezeichnet wird.Notides (1972),der ebenfalls mit menschlichem Uteruszytosol gearbeitet hat,konnte eine solche Kompetition nicht feststellen.Dagegen fand Dreyfürst (1977) im Zytosol von hypernephroiden Nierenkarzinomen eine Inhibition der ^{3}H-Östradiol-17β-Bindung durch Progesteron von 26%.Di Carlo (1974;1975) berichtet von einer Gestagen bedingten Abnahme der Östradiol-Bindungskapazität bis zu 85% beim menschlichen Mammakarzinom und bis zu 80% beim Rattenuterus.
Meine Beobachtungen über die Empfindlichkeit des zytosolischen Östrogen-Rezeptors gegenüber Pronase wird bestä-

tigt durch Notides (1972),der nach Zugabe von Pronase zum Zytosol einen Verlust der Östradiol-Bindung beschreibt.
Die isoelektrische Fokussierung und die Ionenaustauscherchromatographie zeigen trotz Inkubation des Zytosols mit unterschiedlichen Konzentrationen an radioaktiv markiertem Hormon immer nur einen Peak.Die sich bei einem Teil der Scatchard-Plots abzeichnende zweite Bindungskomponente ließ sich auch mit diesen Methoden,möglicherweise aus den oben dargelegten Gründen,nicht verifizieren.
Der von mir gefundene isoelektrische Punkt bei pH 6,45 stimmt gut überein mit den Daten von De Sombre (1969),Puca (1971) und Jensen (1972).Diese Autoren nennen für den Kalbsuterus einen 8S-Binder mit einem Peak im sauren Bereich (pH 5,8-6,2) und einen 4S-Binder mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 6,4-7,0.
Die Untersuchungen über das Sedimentationsverhalten des Hormon-Rezeptor-Komplexes im menschlichen Uteruszytosol ergaben Östradiol bindende Komponenten im 4S- und 8S-Bereich.
Nach Little (1973) sedimentieren in der Region von 4S monomere Steroidhormonrezeptoren.
Über die Entstehung des 8S-Komplexes gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben.Entweder handelt es sich um ein Oligomer des Rezeptors (Jungblut,1976;Puca,1971) oder um eine Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an andere bisher nicht identifizierte zytosolische Proteine (King,1974).
Während ich für den Rattenuterus nur einen monophasischen Scatchard-Plot erhalten habe,was für nur eine Bindungskomponente spricht,wird von Michel (1974) beschrieben, daß es sich bei den 4S- und 8S-Komplexen um zwei verschiedene Bindungskomponenten handelt,die in Affinität,Kapazität und Spezifität differieren.
Ausgehend von der Überlegung,daß die Verhältnisse beim menschlichen Uterus ähnlich sein könnten,wurden weiterführende Untersuchungen vorgenommen (s.C.VIII),die jedoch keine Unterschiede,sondern gleiche Affinitäten für den 4S- und 8S-Bereich ergaben.

So vermute ich,daß für den Hormonrezeptor im menschlichen Uteruszytosol das Gleiche gilt wie für Östradiolrezeptoren in anderen Zielorganen (Wittliff,1971,1972; Puca,1971;Notides,1973;King,1974):daß das radioaktiv markierte Östrogen mit dem Rezeptor einen 4S-Komplex bildet, der die Eigenschaft hat zu aggregieren.Dabei kommt es jedoch nicht zu einer Änderung des Bindungsverhaltens.
Die Technik der Agargelelektrophorese gilt als eine der akkuratesten und informativsten Methoden für die Rezeptoranalyse in Zielorganen,denn sie trennt den Steroidhormon-Rezeptor-Komplex von freiem Hormon,charakterisiert das Rezeptormolekül durch seine elektrophoretische Mobilität und unterscheidet zwischen Rezeptor und Serumkontaminationen,die bei anderen Untersuchungstechniken einen Rezeptor vortäuschen könnten.Die Agargelelektrophorese ist damit nach Ansicht einiger Autoren (Wagner,1972) der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation,der Dextrankohle-Methode und der Sephadex-Gelfiltration überlegen.
In meinen Experimenten zeigte sich jedoch sehr schnell, daß diese Methode für eine Auftrennung der ^{3}H-Östradiol-17β bindenden Komponenten im Zytosol des menschlichen Uterus nicht geeignet ist.Die vergleichend am Rattenuterus durchgeführten Untersuchungen ließen dagegen das bekannte Auftrennungsprofil erkennen.
Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist zur Zeit nicht möglich.Da die isoelektrische Fokussierung sowohl für den zytosolischen Östrogenrezeptor des Rattenuterus (Bojar,1978) als auch für den des menschlichen Gewebes (eigene Daten) einen isoelektrischen Punkt im sauren pH-Bereich ergeben hat,wäre theoretisch ein entsprechendes Verhalten bei der Agargelelektrophorese zu erwarten.
In meiner Arbeit habe ich versucht,mit verschiedenen Methoden den Östrogenrezeptor im menschlichen Uterus zu analysieren.Dabei konnte e i n e hochaffine Bindungskomponente sicher nachgewiesen werden,während ein zweiter Binder mit geringerer Affinität nur in einem Teil der Experimente zur Darstellung kam.Für die hochaffine Bindungs-

komponente wurde in Gegenwart hoher Hormonkonzentrationen eine negative Beeinflussung beobachtet.Ich habe versucht,dieses Verhalten durch ein Modell zu erklären,das von dem gängigen Modell der negativen Kooperativität abweicht.

E. Literaturverzeichnis

Alberga,A., Jung,J., Massol,N., Raynaud,J.P., Raynaud-Jammet,C., Rochefort,H., Truong,H. & Baulieu,E.E. (1970) in: Advances in the Biosciences 7, 45 (Raspe,G., Hrsg.) Pergamon Press, New York

Berson,S.A. & Yalow,R.S. (1959) J.Clin.Invest. 38, 1996

Best-Belpomme,M., Fries,J. & Erdos,T. (1970) Europ.J.Biochem. 17, 425

Block,G.E., Jensen,E.V. & Polley,Th.Z. (1975) Ann.Surg. 182, 342

Bojar,H. (1978) persönliche Mitteilung

Bojar,H. (1980a) Beckman Report 2/80

Bojar,H., Stuhldreier,B., Schremmer,C.N., Konrad,R.M. & Staib,W. (1980b) Steroidrezeptorverteilung in Bronchialkarzinomen.Hinweise auf eine mögliche regulatorische Funktion von Glucocorticoiden und Gestagenen auf den Tumorstoffwechsel. Im Druck

Bojar,H. (1980c) persönliche Mitteilung

Cake,M.H. & Litwack,G. (1975) in: Biochemical Actions of Hormones 3, 317 (Litwack,G., Hrsg.) Academic Press, New York

Di Carlo,F., Blisa,M. & Conti,G. (1974)
Atti Soc.Ital.Sci.Veter. 28, 358

Di Carlo,F., Pacilio,G. & Conti,G. (1975)
Tumori 61, 501

Crabtree,G.R., Smith,K.A. & Munck,A. (1978)
Cancer Res. 38, 4268

Dreyfürst,R. (1977)
Dissertationsschrift,Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Düsseldorf

De Duve,C., Berthlet,J. & Beaufay,H. (1959)
in: Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry 9, 325
(Butler,J.A.V. & Katz,B., Hrsg.) Pergamon Press, New York

Eldefrawi,M.E., Eldefrawi,A.T., Seifert,S. & O'Brien,R.D. (1972)
Arch.Biochem.Biophys. 150, 210

Erdos,T., Bessada,R., Best-Belpomme,M., Fries,J., Gospodarowicz,D., Menahem,M., Reti,E. & Veron,A. (1971)
in: Advances in the Biosciences 7, 119
Pergamon-Vieweg, Oxford

Eriksson,H., Upchurch,S., Hardin,J.W., Peck,E.J. & Clark, J.H. (1978)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 81, 1

Haglund,H. (1971)
Methods Biochem.Anal. 19, 1

Jensen,E.V. & Jacobson,H.J. (1962)
Recent Progr.Horm.Res. 18, 387

Jensen,E.V., Suzuki,T., Kawashima,T., Stumpf,W.E., Jungblut,P.W. & De Sombre,E.R. (1968)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 59, 632

Jensen,E.V., Suzuki,T., Numata,M., Smith,S. & De Sombre, E.R. (1969)
Steroids 13, 417

Jensen,E.V. & De Sombre,E.R. (1972)
Ann.Rev.Biochem. 41, 203

Jungblut,P.W. (1976)
in: Biologisches Kolloquium der Universität Düsseldorf

King,R.J.B. & Mainwaring,W.I.P. (1974)
in: Steroid-Cell Interactions 1, 1
(King,R.J.B. & Mainwaring,W.I.P., Hrsg.) Butterworths, London

Koblet,H.
in: Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Korenman,S.G. & Rao,B.R. (1968a)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 61, 1028

Korenman,S.G. (1968b)
J.Clin.Endocr.Metab. 28, 127

Korenman,S.G. (1969)
Steroids 13, 163

Levitzki,A. & Koshland,D.E. (1969)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 62, 1121

Lippmann,M.E., Yarbro,G.K. & Leventhal,B.G. (1978)
Cancer Res. 38, 4251

Little,M., Szendro,P.J. & Jungblut,P.W. (1973)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 1599

Lowry,O.H., Rosebrough,A.L., Farr,A.L. & Dall,R.J. (1951)
J.Biol.Chem. 193, 265

Martin,R.G. & Ames,B.N. (1961)
J.Biol.Chem. 236, 1372

McGuire,W.L., Horwitz,K.B., Pearson,O.H. & Segaloff,A. (1977)
Cancer 39, 2934

Mester,J., Robertson,D.M., Feherty,P. & Kellie,A.E. (1970)
Biochem.J. 120, 831

De Meyts,P., Roth,J., Neville,D.M., Gavin,J.R. & Lesniak, M.A. (1973)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 55, 154

Michel,G., Jung,J., Baulieu,E.E., Aussel,C. & Uriel,J. (1974)
Steroids 24, 437

Notides,A.C., Hamilton,D.E. & Rudolph,J.H. (1972)
Biochem.Biophys.Acta 271, 214

Notides,A.C., Hamilton,D.E. & Rudolph,J.H. (1973)
Endocrinology 93, 210

Porath,J. & Flodin,P. (1959)
Nature 183, 1657

Puca,G.A., Nola,E., Sica,V. & Bresciani,F. (1971)
Biochemistry 10, 3769

Riesner (1980)
Rezeptormeeting in Düsseldorf

Sanborn,B.M., Rao,B.R. & Korenman,S.G. (1971)
Biochemistry 10, 4955

Scatchard,G. (1949)
Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660

Schachmann,H.K. (1959)
in: Ultracentrifugation in Biochemistry 1, 1
(Schachmann,H.K., Hrsg.) Pergamon Press, New York

De Sombre,E.R., Puca,G.A. & Jensen,E.V. (1969)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 64, 148

De Sombre,E.R., Carbone,P.P., Jensen,E.V., McGuire,W.L.,
Wells,S.A., Wittliff,J.L. & Lipsett,M.B. (1979)
New Engl.J.Med. 301, 1011

Steggles,A.W. & King,R.J.B. (1972)
Europ.J.Cancer 8, 323

Toft,D. & Gorski,J. (1966)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 55, 1574

Wagner,R.K. (1972)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1235

Wegner,L.A. & Winkelmann,H. (1970)
Atompraxis 16, 19

Westphal,U. (1971)
in: Steroid-Protein Interactions 1
(Gross,F., Labhart,A., Mann,T., Samuels,L.T. & Zander,J.,
Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Wittliff,J.L., Hilf,R., Brooks,W.F., Savlov,E.D., Hall,
T.C. & Orlando,R.A. (1971)
Cancer Res. 32, 1983

Wittliff,J.L., Gardner,D.G., Battema,W.L. & Gilbert,P.J. (1972)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 48, 119

Wittliff,J.L. (1974)
Seminars in Oncology 1, 109

Yarbro,G.S.K., Lippmann,M.E., Johnson,G.E. & Leventhal, B.G. (1977)
Cancer Res. 37, 2688

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof.Dr.H.Bojar für die Überlassung des Themas,seine vielfachen Anregungen,Ratschläge und die weiterführenden Diskussionen.

Herrn Prof.Dr.W.Staib danke ich für den Arbeitsplatz im Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors 32 für die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 8.5.1954 wurde ich als Tochter des Studiendirektors Dr.Eugen Bärhausen und seiner Frau Maria,geb. Schindelek, in Berlin geboren.

Im April 1961 wurde ich in die Katholische Grundschule St.Ludwig in Berlin-Wilmersdorf eingeschult.Dort blieb ich 4 Jahre und wechselte dann im April 1965 auf die Franziskus-Schule in Berlin-Schöneberg über.Nach zwei weiteren Grundschuljahren wurde ich im April 1967 in die Franziskus-Oberschule übernommen.Nach einem erneuten Schulwechsel besuchte ich vom April 1970 an die Walther-Rathenau-Oberschule in Berlin-Grunewald (Bezirk Wilmersdorf),an der ich am 12.12.1973 mein Abitur machte.

Vom Sommersemester 1974 bis zum Wintersemester 1980/81 studierte ich an der Universität Düsseldorf Medizin.In dieser Zeit arbeitete ich vom November 1977 bis zum März 1979 im Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf (Direktor Prof.Dr.W.Staib) an meiner Dissertation.

Am 28.10.1980 bestand ich vor dem Landesprüfungsamt Nordrhein-Westfalen die Ärztliche Prüfung und erhielt mit Wirkung vom 12.11.1980 die Approbation als Arzt.

Seit dem 1.1.1981 arbeite ich als Assistenzärztin im Humboldt-Krankenhaus,örtlicher Bereich Tegel-Süd,in Berlin-Reinickendorf.